



Développement d'un endomicroscope multiphotonique compact et flexible pour l'imagerie in vivo haute résolution de tissus biologiques non marqués

Guillaume Ducourthial

► To cite this version:

Guillaume Ducourthial. Développement d'un endomicroscope multiphotonique compact et flexible pour l'imagerie in vivo haute résolution de tissus biologiques non marqués. Optique / photonique. Université de Limoges, 2014. Français. NNT : 2014LIMO0004 . tel-01086081

HAL Id: tel-01086081

<https://theses.hal.science/tel-01086081>

Submitted on 21 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 521
Institut de Recherche XLIM-UMR 7252 – Département Photonique

Thèse

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline: Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes
Spécialité : Photonique

Présentée et soutenue par

Guillaume DUCOURTHIAL

le 24/09/2014

**Développement d'un endomicroscope multiphotonique compact et
flexible pour l'imagerie in vivo haute résolution de tissus biolo-
giques non marqués**

Thèse dirigée par : Frédéric LOURADOUR

JURY :

Rapporteurs

Mme. Marie-Claire SCHANNE-KLEIN	Directeur de Recherche CNRS, Laboratoire d'Optique et de Biosciences, Ecole Polytechnique, Palaiseau.
M. Hervé RIGNEAULT	Directeur de Recherche CNRS, Institut Fresnel, Université Aix-Marseille, Marseille.

Examineurs

Mme. Geneviève BOURG-HECKLY	Maître de Conférences, Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
Mme. Cathie VENTALON	Chargée de Recherche CNRS, Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, Paris.
Mme. Anne DRUILHE	Chargée de Recherche INSERM, Laboratoire CRIBL, Université de Limoges
M. Alexandre KUDLINSKI	Maître de Conférences, Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules, Université Lille 1, Lille
M. Rodney O'CONNOR	Chercheur titulaire de la Chaire Santé de Biophysique du Labex SigmaLim, Institut de Recherche XLIM, Limoges.
M. Frédéric LOURADOUR	Professeur, Institut XLIM, Université de Limoges

Invitées

Mme. Christine VEVER-BIZET	Chargée de Recherche CNRS, Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI
Mme. Mireille VERDIER	Maître de Conférences, Equipe Homéostasies Cellulaires et Pathologies, Université de Limoges

à mes parents

Remerciements

Trois années sont passées. Qui aurait pu s'imaginer que le temps se serait si vite écoulé ? Je ne serai jamais arrivé où j'en suis actuellement sans l'aide de plusieurs personnes. Cela aurait été de plus moins plaisant sans la présence de beaucoup d'autres. Comme elles sont nombreuses, je m'excuse par avance si j'en oublie certaines.

Je remercie tout d'abord Marie-Claire Schanne-Klein et Hervé Rigneault qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. J'espère que cette lecture aura été agréable. Je tiens également à remercier les autres membres de mon jury, Geneviève Bourg-Heckly, Cathie Ventalon, Anne Druilhe, Alexandre Kudlinski et Rodney O'Connor, Christine Vever-Bizet, Mireille Verdier, pour l'intérêt porté à ces travaux ainsi que pour leurs différentes contributions.

Je souhaite remercier les directeurs successifs du département photonique de l'institut de Recherche Xlim au sein duquel ont été réalisés ces travaux, Alain Barthelemy et Vincent Couderc, pour m'avoir accueilli au sein du département pour la réalisation de cette thèse.

Toute ma reconnaissance à la région Limousin qui m'a financé durant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Frédéric Louradour, qui m'a donné l'opportunité de travailler à ces côtés sur des sujets qui m'ont passionné. Je te remercie pour ton aide, tes conseils, et nos discussions. Je te remercie également de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions grâce à tes multiples recherches de financements et de collaborations. Merci de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même. Merci d'avoir compris comment me faire plaisir : « une entrecôte frites ». Et bien sûr, je te remercie d'avoir supporté mes fautes d'orthographe.

Je remercie aussi Tigran Mansuryan, alias MacTigran qui est la version Arménienne de MacGiver. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi sur le projet. Merci de m'avoir fait rêver au labo avec tes astuces, tes manières de procéder, tes échantillons, nos discussions en français, et tes expressions : « touche pas la table », « c'est le stagiaire » ;-). Et pour rappel, il y a toujours une solution à chaque problème : « double face ». Merci à Pierre Leclerc pour ta participation au projet, ta bonne humeur, et nos pauses café. Je te souhaite de prendre mon relai et de passer comme moi trois fantastiques années, enfin c'est un peu moins drôle lors de la rédaction, mais on s'y fait ;-). Je souhaite remercier Marc Fabert, et non pour une fois je ne

t'oublie pas. Merci pour ton aide, tes précieux conseils, ta bonne humeur et tes blagues (parfois violentes ^^). Merci aux personnes qui m'ont précédé : Jérôme, Meri..., pour leurs conseils et astuces et les bons moments. Et merci aux autres personnes avec qui j'ai interagi dans le cadre de cette thèse : Julien B, Dominique P, Vincent P, Sylvia, Renaud, Donald, Hector, Lluís....

Je tiens aussi à remercier Alain Dexet au talent certain. Merci pour tes pièces sur mesures qui ont permis la concrétisation du projet. C'est promis j'arrête avec les pièces de plus en plus petites. Je remercie également Nathalie Buisson, pour sa sympathie, sa bonne humeur, et pour avoir toujours répondu présente lorsque j'avais besoin. Tu es géniale ! De manière un peu plus générale, je remercie les membres du département photonique pour avoir permis d'associer un cadre sérieux à une bonne ambiance : les repas, les quizz, les cafés, les gâteaux, les bonbons...

Je tiens tout particulièrement à remercier l'équipe IRO pour avoir hébergé au calme et au frais lors d'une partie de la rédaction, le grand clandestin que je suis ;-).

Je souhaite aussi remercier les différentes personnes dont j'ai fait la connaissance au cours des années que j'ai passées à l'université de Limoges et qui sont devenues dans mon cœur de vrais amis. Je commence par ordre chronologique avec Romain Baudoin le roi du rangement. Un grand bravo pour ton bureau en carton (RS tout de même), il est suuuuuper beau. Je te remercie pour toutes ces années, et surtout pour les derniers mois, tu m'as permis de me changer les idées avec le tir à la canette, le vol d'hélicoptère télécommandé (il faut que l'on se fasse un parcours), ou encore le kart (« rien ne sert de courir il faut partir à point »). Je remercie également Pierre Medrel qui prépare entre autres le thon comme un chef. Merci pour ta tourte maison super légère qui a rendu ta maman malade ;-), tes mojitos basilic, tes discussions incompréhensibles avec Romain, ta culture cinématographique... Merci aussi à ta moitié Émilie Tabaraud, merci pour tes conseils, ..., on se fait une petite randonnée ;-). Merci également à Philippe Rigaud, pour tous ces bons moments, ses fabuleux gâteaux, et tes expressions « chic chic chic », Un grand merci à Jean-Thomas Gomes, alias JK (Jean Kebab), toi pour qui gastronomie rime avec kebab. Je te remercie pour tout : le live, le sport, les cafés, ton soutien, tes conseils... J'ai toujours pu compter sur toi alors merci. Merci à Sophie Levet, future madame Gomes, pour son aide, ses conseils, sa joie de vivre, son côté délirant « limonette », son autorisation à jouer avec mon copain aux jeux vidéo (merci maman ;-)). Je vous souhaite beaucoup de bonheur. Merci à Farid El Bassri, pour ces bons moments, ces cafés. J'aurai toujours un pied de table chez moi pour que tu puisses te stabiliser même si c'est pas bien français tout ça ^^.

Ludovic Szemendera, le petit dernier qui porte très bien les jupes. Merci pour les après-midi bricolage et les soirées billard... Malgré l'éloignement, j'espère rester proche de vous tous, et pouvoir continuer nos moments tels que les weekends ski entre amis. La liste est encore longue donc merci à tous.

Je souhaite pour conclure remercier mes parents qui ont cru en moi et ont tout fait pour me permettre d'aller jusqu'au bout de mes rêves. Merci à toute ma famille.

Tables des matières

Remerciements	ii
Tables des matières	v
Introduction	1
Chapitre 1 :Intérêt de l'imagerie multiphotonique par fibre optique dans le domaine biomédical	3
I. Introduction à la microscopie multiphotonique	3
1. Imagerie biphotonique	4
a. Nature des signaux utiles pour l'imagerie à deux photons	4
i. Fluorescence excitée à deux photons	4
ii. Génération de seconde harmonique.....	6
b. Architecture d'un microscope biphotonique.....	10
c. Bénéfices apportés par l'imagerie biphotonique.....	10
d. Inconvénients de l'imagerie biphotonique.....	11
2. Réponses multiphotoniques d'ordre supérieur.....	12
a. Fluorescence à 3 photons (3PEF).....	12
b. Génération de troisième harmonique (THG)	13
c. Diffusion Raman	13
II. L'imagerie multiphotonique dans le secteur biomédical	14
1. Imagerie clinique.....	15
a. Microscopie multiphotonique pour l'histologie sur biopsies.....	15
b. Microscopie multiphotonique in vivo in situ	16
2. Recherche en biologie	17
a. Embryologie.....	17
b. Etude de moyens thérapeutiques.....	17
c. Neurosciences	18
III. Intérêt potentiel de l'imagerie multiphotonique par fibre optique	18
1. En clinique humaine.....	19
a. Inconvénients liés à la réalisation de biopsies ex-vivo	19
b. Exemples de solution pour le diagnostic optique in vivo in situ	19
2. En recherche en biologie.....	20
a. Etude du développement d'une pathologie.....	20
b. Neurosciences	21
IV. Cahier des charges de l'appareil visé par la présente étude :	23
Chapitre 2 : Dispositifs pour l'imagerie non linéaire par fibre optique.....	27
I. Architecture d'un endomicroscope multiphotonique	27
1. Le laser	27
2. La fibre optique	28
a. Fibre multi-cœur	28
b. Fibre à cœur unique à double gaine (en anglais : Double Clad Fiber, DCF).....	31
i. Fibre à double gaine en silice dopée	31
ii. Fibre à double gaine à microstructure air-silice non dopée	32

3. Moyens de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre endoscopique	37
a. Effets linéaires.....	37
i. Dispersion chromatique	37
ii. Biréfringence	42
b. Effets non-linéaires	42
4. Dispositifs d'imagerie par balayage pour la microendoscopie	44
a. Balayage du faisceau à l'aide d'un microsystème électromécanique (MEMS)..	44
b. Balayage de la fibre avec actuation à l'aide d'une céramique piézoélectrique ..	45
5. Micro-optique.....	47
a. Microlentilles GRIN	48
b. Microsystème optique à doublets achromatiques	49
6. Détection	49
II. Exemples d'endomicroscopes multiphotoniques opérationnels	51
1. Montages expérimentaux	51
2. Performances.....	53
Chapitre 3 : Choix d'une architecture avancée pour la réalisation d'un endomicroscope multiphotonique	59
I. Fibre à double gaine sur mesure pour la biophotonique	59
1. Fabrication de la fibre optique	59
2. Caractéristiques fondamentales de la fibre T1628C	60
a. Cœur central.....	60
b. Caractéristiques de la deuxième gaine collectrice	63
3. Fibres commerciales concurrentes	64
4. Tests comparatifs	65
a. Résolution	65
b. Efficacité de collection.....	67
II. Précompensation des effets linéaires et non-linéaires.....	69
1. Présentation du dispositif de précompensation.....	69
a. Gestion des effets non-linéaires	69
b. Gestion des effets linéaires jusqu'à l'ordre 3 inclus	71
2. Caractérisation des impulsions comprimées en bout de fibre endoscopique.....	73
III. Détection en comptage de photons.....	77
1. Introduction	77
2. Caractérisation du compteur	77
Chapitre 4 : Mise au point d'un microscope multiphotonique fibré	81
I. Présentation du dispositif	81
II. Mesure des performances du microscope multiphotonique fibré :	84
1. Résolution transverse Δx	84
2. Résolution axiale Δz	85
3. Distorsions	85
III. Exemples d'images données par le microscope multiphotonique fibré :	86

1. Image en SHG d'un cristal de BBO.....	86
2. Image de tendons de queue de rat	87
3. Images de tissus pulmonaires.....	89
4. Imagerie tridimensionnelle en profondeur	90
IV. Perspective applicative : microscope multiphotonique à main	92
Chapitre 5 : Développement d'un endomicroscope multiphotonique	95
I. Micro-scanner à fibre optique	95
1. Architecture du micro-scanner.....	96
2. L'actuateur piézoélectrique	97
a. Présentation générale	97
b. Caractérisation	99
i. Circuit d'alimentation de l'actuateur	99
ii. Caractérisation de l'actuateur	100
3. Résonateur à fibre optique	102
a. Présentation du résonateur mécanique.....	102
b. Fréquence de résonance du scanner à fibre microstructurée air-silice.....	103
c. Caractérisation du résonateur.....	105
i. Anisotropie du résonateur	107
ii. Couplages entre les 2 axes de commande	108
d. Recherche du mode d'excitation optimal.....	108
4. Mise en œuvre du micro-scanner pour la formation d'une image par balayage.....	114
a. Choix de la figure de balayage.....	114
b. Propriétés du balayage en spirale pour la formation d'une image.....	115
c. Acquisition d'une séquence d'images.....	117
i. Amortissement libre de la fibre.....	117
ii. Application d'un freinage pour la formation d'images successives.....	119
II. Micro-optiques	120
1. Choix et simulation de la micro-optique.....	121
2. Autre lentille commerciale possible.....	122
3. Etude expérimentale comparative	123
a. Résolution	123
b. Champ de vue	124
c. Efficacité de collection.....	124
III. Construction de l'image.....	126
IV. Mesure des performances de l'endomicroscope multiphotonique	127
1. Rappel des résolutions transverse Δx et axiale Δz	128
2. Distorsions	129
V. Exemples d'images données par l'endomicroscope multiphotonique	130
1. Images de tendon de queue de rat	130
2. Images de tissu pulmonaire.....	131
3. Imagerie tridimensionnelle en profondeur	132

Chapitre 6 : Endomicroscopie multiphotonique <i>in vivo</i> de tissus vivants non marqués	135
I. Protocole biomédical.....	135
II. Tests préliminaires ex-vivo et comparaisons avec des tissus marqués	136
1. Imagerie multiphotonique de coupes de rein fixé et comparaison avec un marquage au Trichrome de Masson :	137
2. Imagerie multiphotonique de coupes de rein fixée et comparaison avec un marquage au Rouge Sirius	139
III. Observation de la fibrose rénale ex vivo	142
1. Observation des différents stades de développement de la maladie avec le microscope multiphotonique fibré	142
2. Observation avec l'endomicroscope multiphotonique.....	144
IV. Observations avec l'endomicroscope <i>in vivo</i> de tissus vivants non marqués.....	145
1. Protocole expérimental	145
2. Observations <i>in vivo</i>	146
Conclusion générale	155
Annexes	159
Annexe A : Acquisitions diverses réalisées à partir des dispositifs développés	161
Annexe B : Tableau comparatif des endomicroscopes multiphotoniques utilisés <i>in vivo</i> .	169
Bibliographie.....	171
Table des illustrations	183
Table des tableaux.....	195

Introduction

L'imagerie optique au sens large a toujours constitué un outil essentiel pour la biologie et la médecine. Alors que tout avait commencé par de simples observations à l'œil nu puis rapidement à l'aide de loupes, énormément de progrès ont eu lieu au cours des siècles avec le développement de microscopes de plus en plus performants. De nos jours, en médecine, l'imagerie cellulaire est le plus souvent rattachée à une spécialité : l'anatomopathologie. Cette dernière étudie les lésions macroscopiques et microscopiques à l'échelle cellulaire. Elle nécessite le passage par plusieurs étapes que sont le prélèvement des tissus, l'analyse macroscopique, et l'analyse microscopique optique. Pour cette dernière, plus communément appelée histologie, il existe différentes modalités d'observation :

- la microscopie en lumière blanche qui utilise des marqueurs colorés.
- la microscopie de fluorescence plein champ ou confocale.
- la microscopie en lumière polarisée qui détecte les variations de polarisation générées par l'échantillon (exemple : biréfringence du collagène)

La recherche en biologie ainsi que la médecine nécessitent toujours de nouveaux contrastes optiques permettant d'obtenir un « nouvel angle de vue ». Pour cela, plusieurs nouvelles modalités d'imagerie se développent. Parmi les plus innovantes, on peut notamment citer :

- la microscopie polarimétrique [Pierangelo 11, 13] qui est une analyse complète de l'anisotropie optique des tissus.
- la tomographie par cohérence optique (en anglais : Optical Coherence Tomography, OCT) [Assayag 13] ; il s'agit là d'une analyse interférométrique permettant de révéler la morphologie des tissus.
- l'imagerie photothermique et photoacoustique [Matteau-Pelletier 13] qui sont des modalités d'imagerie s'appuyant sur analyse respectivement de la chaleur ou de l'onde acoustique produites lors de la désexcitation de la matière biologique ayant absorbée de l'énergie sous forme de photons.
- la bioluminescence, il s'agit là de l'observation de tissus marqués à l'aide de luciférines, dont l'oxydation, contrôlée par une enzyme, la luciférase, conduit à l'émission de lumière.

- la microscopie multiphotonique qui s'appuie sur des processus d'interaction non linéaires entre la matière biologique et plusieurs photons.

Cette dernière sera le point central de ce manuscrit de thèse qui est composé de six chapitres, organisé de la manière suivante :

Le premier chapitre sert d'introduction au sujet. Il commence par une présentation générale de quelques contrastes multiphotoniques tels que la microscopie biphotonique. Des exemples d'application dans le domaine biomédical ainsi que les limitations actuelles sont abordés. Il présente ensuite les enjeux liés à la conception d'un endomicroscope multiphotonique au travers d'applications prospectives.

Le deuxième chapitre fait un état de l'art du domaine de l'endomicroscopie biphotonique. Celui-ci permettra de mieux comprendre point par point les difficultés et limitations liées à la réalisation de cet instrument. Puis nous finirons par deux exemples d'architectures complètes ayant été utilisés in vivo sur petit animal vivant anesthésié.

Le troisième chapitre présentera les choix technologiques innovants réalisés dans le cadre de ce projet. Je démontrerai les performances et avantages de ceux-ci, par exemple en les comparant aux choix généralement vus dans la littérature.

Le quatrième chapitre validera le chapitre 3 en présentant la réalisation d'un microscope multiphotonique fibré. Celui-ci sera alors caractérisé puis utilisé pour l'observation de différents échantillons biologiques non marqués.

Dans le chapitre 5, je réaliserai le développement de la sonde endoscopique dans le but d'obtenir un endomicroscope multiphotonique fonctionnel. Ce dernier sera ensuite caractérisé et utilisé pour l'acquisition d'images d'échantillons biologiques non marqués.

Enfin, ce manuscrit se terminera avec l'utilisation des différents instruments développés dans le cadre d'essais concernant le dépistage de la fibrose rénale chez la souris.

Chapitre 1 : Intérêt de l'imagerie multiphotonique par fibre optique dans le domaine biomédical

I. Introduction à la microscopie multiphotonique

Les imageries multiphotoniques reposent sur la collection de réponses optiques non linéaires provenant de la matière biologique sous l'effet d'intensités lumineuses instantanées incidentes importantes. Pour cela, les excitations utilisées sont de type impulsionnel et le faisceau est focalisé sur l'échantillon. Comme pour l'imagerie confocale, le plus souvent les images sont obtenues point par point et requièrent un balayage de l'objet au cours du temps. La densité de puissance crête nécessaire n'étant présente qu'au point focal, il n'y a pas de réponses générées ailleurs dans l'échantillon. Ceci induit une confocalité intrinsèque, un bon rapport signal sur bruit, un sectionnement optique, et une réduction du photoblanchiment et des photo-dommages. De plus, les longueurs d'onde d'excitation utilisées lors de ces processus sont généralement élevées ce qui permet une réduction de la diffusion par les tissus (diffusion Rayleigh évoluant en $1/\lambda^4$), permettant alors une grande profondeur de pénétration.

Les microscopies multiphotoniques (en anglais : MultiPhoton Microscopy, MPM) sont applicables aux cibles fluorescentes exogènes et endogènes usuellement visées par la microscopie de fluorescence linéaire. Cependant elles apportent dans plusieurs cas une nouvelle vision des échantillons. On peut par exemple détecter la cristallinité des constituants de la matière biologique (analyse structurale) par génération de seconde harmonique (en anglais : Second-Harmonic Generation, SHG) [Stoller 02, 02 b], reconnaître des liaisons moléculaires grâce à l'effet Raman en configuration CARS (Coherent Anti-stokes Raman Scattering) ou SRS (Stimulated Raman Scattering) [Batchelder 91, Okuno 12], ou encore visualiser la présence d'interfaces par génération de troisième harmonique (en anglais : Third-Harmonic Generation, THG) [Chu 03, Oron 04].

Nous allons dans un premier temps nous intéresser à l'imagerie biphotonique.

1. Imagerie biphotonique

a. Nature des signaux utiles pour l'imagerie à deux photons

La microscopie biphotonique repose sur la combinaison de deux photons identiques se situant le plus souvent dans le proche infrarouge (IR). Nous commencerons par nous intéresser à la fluorescence excitée à deux photons (en anglais : Two-Photon Excited Fluorescence, TPEF ou 2PEF) puis nous passerons à la SHG.

i. Fluorescence excitée à deux photons

En 1931, Maria Goeppert-Mayer démontre théoriquement que plusieurs photons peuvent être absorbés simultanément par une molécule fluorescente (Figure 1) [Göppert-Mayer 31]. Les énergies des photons s'additionnent pour atteindre le niveau d'énergie excité. Il fallut attendre 1961 afin que le phénomène soit observé dans un cristal $\text{CaF}_2:\text{Sm}^{2+}$ par Kaiser et Garrett [Kaiser 61]. Ce n'est qu'en 1990 que le premier microscope biphotonique est développé par Winfried Denk [Denk 90].

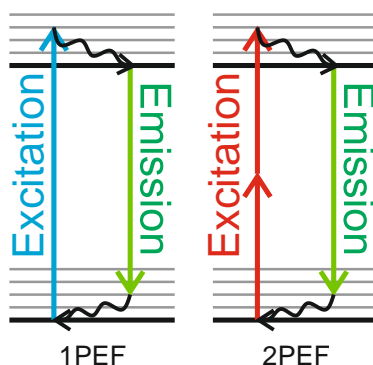


Figure 1 : Diagramme de Jablonski illustrant la fluorescence linéaire à un photon et la fluorescence non linéaire à deux photons.

Le phénomène de fluorescence à deux photons nécessite l'absorption résonante quasi simultanée par une molécule fluorescente de deux photons. Ceci est approximativement équivalent à exciter la cible à la longueur d'onde moitié. L'excitation est alors suivie de l'émission d'un photon ayant une énergie inférieure à l'énergie absorbée à cause de la présence du décalage de Stokes $\Delta\omega_{\text{Stokes}}$ ($\omega_{\text{émis}} < 2\omega_{\text{excitation}}$) (Figure 2) qui est lié à l'existence de désexcitations

non radiatives (Figure 1). Ce processus dépend de la partie imaginaire du tenseur de susceptibilité non linéaire optique de troisième ordre du matériau irradié [Boyd 03]. Il conduit à une émission de lumière de fluorescence qui est incohérente et isotrope.

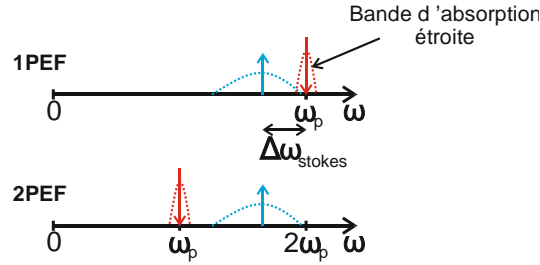


Figure 2 : Réponses en fluorescence linéaire à un photon et en fluorescence non linéaire à deux photons. Rouge : excitation ; Bleu : réponse.

La 2PEF possède l'avantage de pouvoir exploiter les mêmes fluorophores que la 1PEF. Ces deux types de fluorescence présentent toutefois plusieurs inconvénients communs. On peut citer le caractère résonant du processus (passage de la molécule de l'état fondamental à l'état excité) qui provoque l'apparition de bande d'absorption relativement étroite ($\ll 100$ nm), ce qui peut représenter une contrainte car il faut que la longueur d'onde du laser de pompe se situe à l'intérieur de cette bande d'absorption. De plus, la molécule dans son état excité peut interagir avec le dioxygène environnant et ainsi induire le photoblanchiment de la molécule elle-même ce qui a pour conséquence une perte progressive du signal.

Afin d'augmenter la probabilité que l'effet non linéaire attendu se produise, il faut maximiser le nombre de photons présents au même endroit au même moment. Pour cela il est nécessaire de recourir à des impulsions très brèves (femtosecondes), que l'on focalise sur l'échantillon. Dans le cas d'un échantillon homogène, on peut montrer [Hopt 01, Xu 96] que le signal de fluorescence à deux photons, F_{2PEF} , dépend de façon quadratique de la puissance moyenne d'excitation $\langle P(t) \rangle$:

$$F_{2PEF} = \alpha \langle P(t) \rangle^2 \quad (1.1)$$

avec :

$$\alpha = \frac{1}{2} \Phi \eta(\lambda) C \delta \frac{G_p}{f \tau} \frac{8n}{\pi \lambda} \quad (1.2)$$

- F_{2PEF} : flux moyen de photons 2PEF détecté.
- Φ : efficacité de collection de la fluorescence du système de détection, dans une configuration en épi-détection (optique de focalisation = optique de collection).
- $\eta(\lambda)$: efficacité quantique de fluorescence de la molécule excitée.
- C : concentration en molécules fluorescentes.
- δ : section efficace d'absorption à deux photons de la molécule.
- G_p : coefficient sans dimension dépendant de la forme temporelle des impulsions excitatrices.
- f : fréquence de répétition des impulsions.
- τ : durée à mi-hauteur des impulsions (FWHM).
- n : indice de réfraction.
- λ : longueur d'onde d'excitation.

On constate ainsi que le signal 2PEF est indépendant de la taille du point focal. Il dépend cependant de l'ouverture numérique de l'optique de focalisation via la valeur du paramètre Φ .

ii. Génération de seconde harmonique

Dans un milieu non-centrosymétrique, tel qu'un tissu constitué de fibres de collagène de type I, lorsque l'on focalise des impulsions brèves, on génère par effet non linéaire non résonnant d'ordre 2, une onde lumineuse cohérente de fréquence double de celle de l'excitation [Boyd 03, Duboisset 09, Pena 06, Revillod 06]. Ce phénomène est appelé génération de seconde harmonique optique (second harmonic generation (SHG) en anglais). Contrairement à la 2PEF, la SHG ne nécessite pas le passage par une étape d'absorption du rayonnement incident. Cela se traduit par l'obtention d'un processus très large bande exempt de décalage Stokes ($\omega_{\text{émis}} = 2\omega_{\text{excitation}}$) (Figure 3).

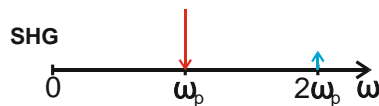


Figure 3 : Génération de seconde harmonique. Rouge : excitation ; Bleu : réponse.

Comme pour la 2PEF, on peut définir la réponse en SHG sous la forme d'une réponse d'ordre 2 :

$$F_{SHG} = \beta \langle P(t) \rangle^2 \quad (1.3)$$

- F_{SHG} : flux moyen de photons harmoniques détectés.
- $\langle P(t) \rangle$: puissance moyenne de l'excitation IR.

De façon analogue au paramètre α qui a été défini pour la fluorescence non linéaire à deux photons, le paramètre β dépend de certains coefficients déjà explicités : Φ , C , G_p , f , τ , n , λ , mais aussi d'autres considérations plus complexes qui sont spécifiques à la SHG. Tout d'abord, pour la SHG il faut faire appel au tenseur de susceptibilité non-linéaire d'ordre 2, $\chi^{(2)}$, qui traduit la polarisabilité non linéaire d'ordre 2 de la cible. Cette quantité, qui est l'homologue de la section efficace d'absorption à deux photons de la molécule δ , est donc un tenseur ce qui confère une complexité accrue à la SHG qui est effectivement sensible au caractère vectoriel du champ excitateur et du champ émis. Plusieurs autres paramètres qui entrent en jeux apparaissent en distinguant les cas suivants :

- 1^{er} cas : molécule non centrosymétrique unique :

Si l'on soumet une molécule unique non centrosymétrique à un champ électromagnétique, il apparaît un dipôle rayonnant induit qui peut émettre à la fréquence double 2ω (Figure 4). De par la dissymétrie du nuage électronique de la molécule, ce phénomène est sensible à la polarisation du champ d'excitateur. Le rayonnement n'est pas isotrope comme en 2PEF mais possède un diagramme de rayonnement bien particulier.

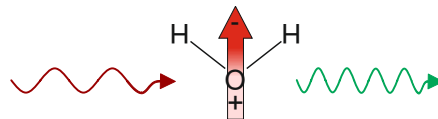


Figure 4 : Génération de seconde harmonique par une molécule unique d'eau.

- 2^{ème} cas : deux molécules non centrosymétriques dans un liquide :

Nous nous intéressons au cas particulier où deux molécules non centrosymétriques sont très proches l'une de l'autre (distance < longueur d'onde excitatrice). Si celles-ci sont alignées parallèlement (Figure 5 a), elles vont

permettre la création de deux ondes à 2ω en phase et interférant de manière constructive. Le champ second harmonique total sera alors doublé et l'intensité quadruplée. Au contraire, si les molécules sont antiparallèles (Figure 5 b), les deux ondes à 2ω seront en opposition de phase et interféreront de manière destructive. Ceci montre que la SHG est sensible à l'ordre local qui règne au sein du matériau irradié.

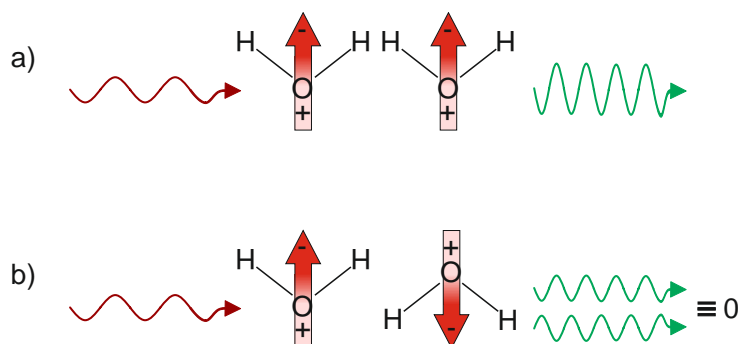


Figure 5 : Génération de seconde harmonique de deux molécules non centrosymétriques très proches ; a) : interférence constructive ; b) : interférence destructive.

- 3^{ème} cas : milieu aléatoire, solvant liquide tel que l'eau ou solide amorphe :

Si l'organisation spatiale des molécules non centrosymétriques est aléatoire, les contributions de ces dernières se combinent afin de produire un signal moyen nul. On parle alors de génération de diffusion harmonique de lumière ou encore de diffusion hyper Rayleigh (en anglais Hyper Rayleigh Scattering, HRS) (voir Annexe A : Mise en place d'un spectroscope Figure A4). Ce signal est faible et il est généralement négligeable. Afin d'obtenir une émission importante cohérente de SHG, l'échantillon irradié doit donc présenter une structure cristalline ordonnée non centrosymétrique.

- 4^{ème} cas : SHG dans un cristal homogène à partir d'un faisceau focalisé :

Contrairement à la 2PEF, la SHG est une émission cohérente de lumière et son diagramme de rayonnement est anisotrope. Dans le cas d'un cristal excité par un faisceau parallèle non focalisé, le rayonnement de SHG est lui aussi collimaté.

Lorsque l'on focalise le faisceau exciteur, il apparaît un déphasage de π de part et d'autre du foyer (phase de Gouy). Dans le cadre de la SHG, et

d'une structure cristalline allongé homogène dans la direction axiale de dimension plus grande que la taille de la zone focale, les conditions d'accord de phase permettent à la SHG de se propager uniquement selon un angle par rapport à l'axe optique formant ainsi deux lobes symétriques orientés vers l'avant [Mertz 01]. Dans le cas d'une cible plus petite que la tache focale la situation est plus complexe et une émission vers l'arrière est alors possible (voir Figure 6). Cette situation est tout particulièrement avantageuse dans une configuration en épi-détection.

- *Cas particulier* : émission de SHG par le collagène fibrillaire de type I :

Le collagène fibrillaire de type I est constitué de fibrilles, dont plusieurs caractéristiques interviennent dans l'intensité et la directivité du signal de SHG produit [Mertz 01, Pena 06, Williams 05, Zipfel 03]. Certains paramètres sont liés aux fibrilles elles même telles que certains des coefficients du tenseur susceptibilité d'ordre 2 du collagène qui composent les fibrilles, de leur distribution spatiale, de leur orientation, de leur taille, qui dépend de leur maturité, mais aussi de leur niveau d'hydratation. D'autres paramètres sont dépendants de la direction d'excitation et de la direction d'observation par rapport aux fibrilles (Figure 6), ou encore de la polarisation incidente, le signal SHG étant lui-même polarisé de façon particulière :

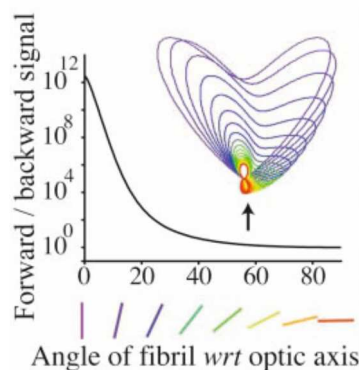


Figure 6 : Rapport entre les réponses en SHG émises par des fibrilles de collagène détectées respectivement vers l'avant et vers l'arrière en fonction de l'inclinaison des fibrilles par rapport à l'axe optique [Zipfel 03]. En haut à droite : diagramme de rayonnement en fonction de l'inclinaison des fibrilles par rapport à l'axe optique qui est indiqué par une flèche.

La SHG est un outil riche et relativement complexe qui n'a pas encore révélé toutes ses possibilités. De nombreux articles sont encore publiés sur ce sujet.

b. Architecture d'un microscope biphotonique

En microscopie biphotonique, on utilise généralement un laser à impulsions ultrabrèves ayant une haute fréquence de répétition. Celles-ci permettent ainsi d'obtenir des densités de puissance crête de l'ordre du GW/cm², tout en conservant des puissances moyennes faibles (quelques dizaines de mW). Cette source laser est alors usuellement associée à un objectif de microscope et à un système de balayage afin de réaliser une image de l'échantillon par balayage au cours du temps (Figure 7). On retrouve alors la configuration classique d'un microscope à balayage tel que les microscopes confocaux. A chaque instant, le faisceau laser excite un point de l'échantillon qui émet une réponse. En configuration d'épi-détection, celle-ci est collectée par le même objectif puis est orientée à l'aide de miroirs dichroïques et de filtres vers le canal de détection correspondant. Le plus souvent, les détecteurs utilisés sont monopixels, et fournissent un signal dont chaque instant correspond à une position sur l'échantillon. Grâce à un système informatique et une table de correspondance (en anglais : look-up table, LUT), une image est reconstruite pour chaque canal de détection. Les images données par ces canaux spectraux, qui sont au nombre de 2 la plupart du temps, peuvent enfin être numériquement superposées pour donner une représentation multicolore dite multimodale.

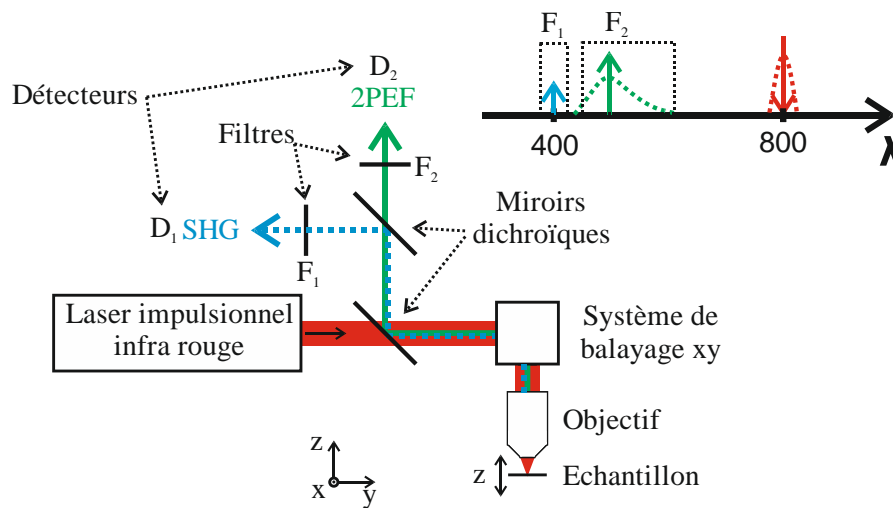


Figure 7 : Microscope biphotonique

c. Bénéfices apportés par l'imagerie biphotonique

Que ce soit pour la 2PEF ou pour la SHG, la densité de photons nécessaire à la production du signal utile n'est présente que dans le volume de focalisation. Il en découle une confocalité naturelle, et donc tous les avantages déjà apportés par la microscopie confocale. On peut

citer à ce sujet l'obtention d'un meilleur contraste, ainsi que la possibilité de réaliser des images en trois dimensions grâce au sectionnement optique. Les imageries multiphotoniques apportent plusieurs avantages supplémentaires dont voici une liste non exhaustive :

- La longueur d'onde d'excitation IR étant plus élevée, cela permet de réduire l'influence de la diffusion lors de l'imagerie en profondeur de tissus biologiques. L'imagerie 3D permise par l'imagerie confocale prend donc ici tout son sens en permettant d'aller à des profondeurs de pénétration maximales se situant entre 500 et 600 microns à 800 nm selon les échantillons [Helmchen 05].
- L'écart en longueur d'onde entre l'excitation et l'émission est tel qu'il est facile de les séparer par des filtres.
- Contrairement à la microscopie confocale classique, la microscopie multiphotonique ne requière pas de trou de filtrage en amont du détecteur qui a pour inconvénient la réduction du niveau de signal. Il est possible d'exploiter l'intégralité de la réponse se présentant devant le détecteur (retour direct ainsi que lumière diffusée). Cela permet de maximiser le niveau de signal.
- L'imagerie multiphotonique permet de plus de réduire le photoblanchiment autour de la zone imagée. Dans le cas de la 2PEF, seul le point focal est soumis au photoblanchiment. La SHG, ne faisant pas intervenir d'absorption, il n'y a pas de photoblanchiment.
- Les réponses en SHG et 2PEF peuvent être spectralement nettement séparées (décalage de stokes pour la 2PEF). Il est alors possible de les différencier à l'aide de filtres [Peyrot 12] sans diaphonie entre ces deux canaux.
- La SHG et la 2PEF peuvent être utilisées avec ou sans marquage des tissus.

d. Inconvénients de l'imagerie biphotonique

En contrepartie des nombreux avantages apportés, la microscopie multiphotonique présente certains inconvénients :

- La MPM nécessite l'utilisation d'une source laser impulsionnelle. Cette dernière peut être plus ou moins complexes, ajustable en longueur d'onde ou non, et représenter un coût pouvant être très élevé selon l'utilisation souhaitée (voir : Chapitre 2 : I. 1.).

- Comme la fluorescence à 1 photon, la fluorescence à 2 photons peut s'accompagner de la production d'oxygène singulet. Il est généré grâce au transfert d'énergie de la molécule excitée à l'état triplet vers l'oxygène présent autour. L'oxygène singulet, qui est une forme excitée de l'oxygène, est toxique pour les cellules environnantes.
- La génération de seconde harmonique ainsi que la fluorescence à 2 photons sont des processus non-linéaires respectivement de deuxième et troisième ordre, de plus faible magnitude que la fluorescence linéaire. Les signaux générés sont alors le plus souvent relativement faibles. Ceci oblige alors à augmenter la puissance excitatrice pouvant alors poser des problèmes de photo-dommages.
- Plusieurs études mettent en effet en avant des problèmes de photo-dommages relatifs aux fortes densités de photons nécessaires à la création d'une réponse de 2PEF ou de SHG. Ces problèmes peuvent se présenter de différentes manières telles que par l'échauffement de la matière, des mutations de l'ADN grâce à l'absorption à trois photons de ce dernier notamment en dessous de 800 nm [Hopt 01] ou encore par la création d'un plasma bombardant l'ADN de particules chargées [D'Souza 11, Dharmadhikari 14].

Le sujet de cette thèse met en œuvre uniquement la 2PEF et la SHG. Cependant les développements qu'elle contient pourront à terme être applicables à d'autres imageries multiphotoniques que je vais brièvement présenter dans le paragraphe ci-dessous.

2. Réponses multiphotoniques d'ordre supérieur

a. Fluorescence à 3 photons (3PEF)

Il est possible d'étendre le principe de l'absorption multiphotonique à un nombre de photons supérieur à 2 (Figure 8).

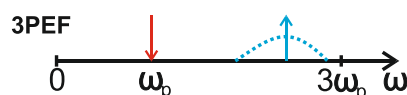


Figure 8 : Réponse en fluorescence à 3 photons. Rouge : excitation ; Bleu : réponse

Ceci présente plusieurs intérêts. En conservant une longueur d'onde d'excitation importante (environ $\lambda_0 = 800$ nm), il est possible en utilisant l'absorption à 3 photons d'exciter des molécules absorbant dans l'ultraviolet (NADH : maximum d'absorption à 260 nm) [Jyothikumar 13]. Pour des constituants classiquement excités entre 300 et 600 nm en fluorescence linéaire, il est aussi possible d'utiliser des longueurs d'ondes beaucoup plus importantes. Ainsi, grâce à la diminution de la diffusion, la 3PEF a permis d'atteindre des profondeurs de pénétrations record d'environ 1,3 mm avec une excitation à $\lambda_0 = 1\,675$ nm [Horton 13]. De plus, le passage à la fluorescence à 3 photons s'accompagne d'une amélioration de la résolution. Le processus d'absorption à 3 photons étant plus rare, il est donc présent dans un volume plus restreint [Horton 13]. Plusieurs travaux ont démontré la possibilité d'augmenter encore le nombre de photons mis en jeu dans le processus de fluorescence (4PEF : [Hernandez 04]) (5PEF : [Zheng 13]).

b. Génération de troisième harmonique (THG)

La génération de troisième harmonique est un effet non linéaire non résonnant du troisième ordre de type $\chi^{(3)}$ qui est obtenu à partir d'hétérogénéités spatiales tel qu'une interface entre deux milieux comme les membranes cellulaires et nucléaires [Luengo-Oroz 12, Olivier 10]. Ce processus correspond à la combinaison de trois photons IR en un photon à la fréquence triple (Figure 9). La THG peut par exemple permettre l'imagerie morphologique de petits organismes en embryologie [Debarre 04].

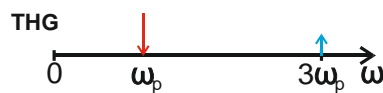


Figure 9 : Réponse en THG. Rouge : excitation ; Bleu : réponse

c. Diffusion Raman

La microscopie SRS (Stimulated Raman Scattering) et CARS (Coherent anti-Stokes Raman scattering) sont des techniques de spectroscopie vibrationnelle reposant sur la diffusion Raman non linéaire qui exploite également la susceptibilité non linéaire $\chi^{(3)}$ de la cible. Elles permettent d'obtenir des informations sur les modes vibrationnels intramoléculaires des constituants de l'échantillon étudié. Dans ces techniques, l'échantillon est excité par un faisceau pompe à ω_p et par un faisceau dit Stokes à ω_s ($\omega_s < \omega_p$). Lorsque la différence de fréquence

entre les faisceaux pompe et Stokes correspond à la fréquence d'une vibration moléculaire Raman Ω particulière, la liaison résonne et cela génère une polarisation non linéaire de l'échantillon. La pompe peut alors être diffusée par la molécule de telle sorte qu'il y a alors consommation de la pompe et amplification du Stokes. Il apparaît de plus le rayonnement d'un signal anti-Stokes ($\omega_{as} = 2\omega_p - \omega_s$) (Figure 10).

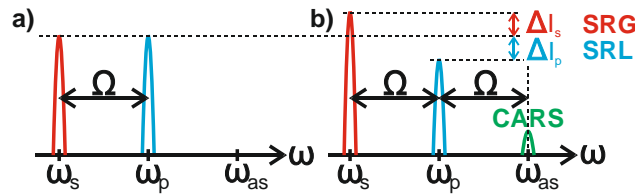


Figure 10 : Réponses en SRS et CARS. a) avant ; b) après réponse de l'échantillon.

Dans le cas de la microscopie SRS, il existe alors deux manières de quantifier ce phénomène : le SRL (Stimulated Raman Loss) qui mesure la perte du signal de pompe et le SRG (Stimulated Raman Gain) qui mesure le gain à la fréquence Stokes. [Xie 14]. Le SRL est généralement préféré car il est exempt du bruit de fond du mélange à quatre ondes non résonant qui est un autre processus concomitant. La microscopie CARS quant à elle, s'intéresse au signal anti-Stokes généré [Gachet 07, Hiramatsu 12, Okuno 12, Volkmer 05].

Nous allons maintenant nous intéresser à la place de l'imagerie multiphotonique dans le domaine clinique ainsi qu'en recherche en biologie.

II. L'imagerie multiphotonique dans le secteur biomédical

De nombreux constituants présents dans l'organisme présentent une réponse non linéaire. On peut par exemple citer pour des réponses en 2PEF, l'élastine [Zipfel 03] qui est un des deux principaux constituants de la matrice extracellulaire, ou bien la kératine [Pena 05] présente dans la peau. On peut aussi évoquer le NADH [Huang 02, Zipfel 03] et les flavoprotéines [Huang 02] qui participent au transport d'énergie au niveau cellulaire. Pour les réponses en SHG, il y a le collagène fibrillaire qui est présent dans tous le corps (tendons [Stoller 02, Freund 86, Roth 80, Zipfel 03 b], peau [Tai 05, Zhuo 06, Luo 09], poumons [Pena 07], reins [Strupler 07], cartilage [Tai 05], cornée [Matteini 09, Vohnsen 08, Yeh 02], ...), la myosine [Plotnikov 06, Tiaho 07], les microtubules [Dombeck 03, Zipfel 03], l'amidon [Mizutani 00] et la cellulose [Brown 03]. L'imagerie multiphotonique est donc toute indiquée pour l'imagerie

d'échantillon biologique sans marquage. Elle reste toutefois utilisable avec les différents marqueurs exogènes (organiques, génétiquement modifiés, nanoparticules métalliques [Gu 10]).

1. Imagerie clinique

a. Microscopie multiphotonique pour l'histologie sur biopsies

Dans le milieu clinique, l'observation d'échantillon est traditionnellement réalisée par les anatomopathologistes par divers techniques de microscopie mais à priori pour l'instant pas par microscopie multiphotonique. Les anatomopathologistes étudient les lésions ou anomalies macroscopiques et microscopiques présentes sur les cellules et les tissus d'un organisme. Cette étude peut avoir pour but le diagnostic de maladies, mais aussi la compréhension des causes et des mécanismes du développement de ces maladies. Les observations sont classiquement réalisées sur des biopsies.

Par exemple, pour révéler la présence de collagène dans des biopsies, les anatomopathologistes ont recours à une des deux colorations types des lames d'échantillons :

- La coloration au Trichrome de Masson : celle-ci fait ressortir le collagène en bleu-vert.
- Le marquage au Rouge Sirius (ou encore Picrosirius red) : ce dernier permet d'augmenter la biréfringence de la cible. En lumière non polarisée, le collagène apparaît en rouge. En microscopie en lumière polarisée, le collagène de type I ressort en jaune-orangée sur fond sombre.

Dans la publication [Strupler 07], il est démontré la possibilité de diagnostiquer la fibrose rénale par imagerie du collagène de type I en utilisant la génération de seconde harmonique (Figure 11). Certaines maladies de dépôt telles que la fibrose du rein sont dues à un développement anormal de fibres de collagène. La SHG peut alors être utilisée comme un moyen d'histologie comparable aux moyens traditionnels pour le dépistage.

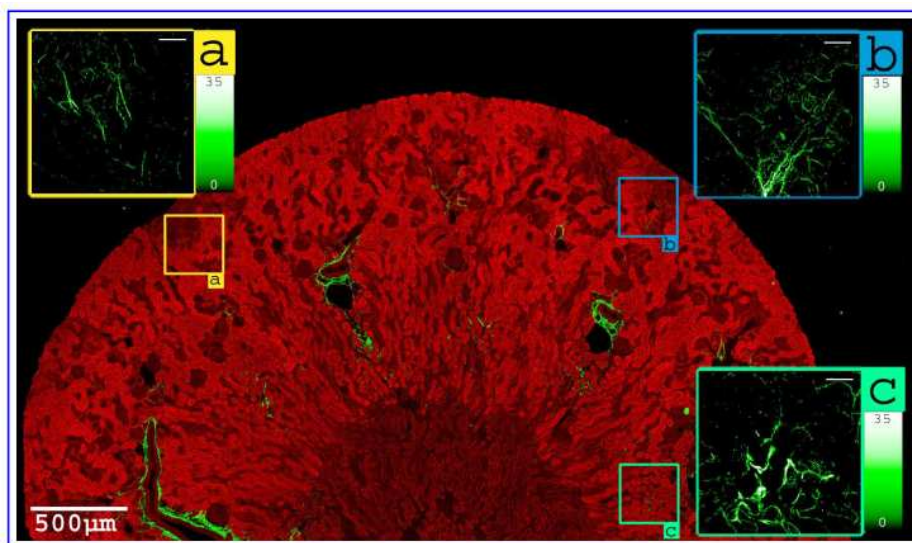


Fig. 5. (2.2 MB) Corrected 2PEF/SHG image mapping 2.3×4.6 mm² of an unlabeled fibrotic murine kidney with 0.8×0.8 μm² pixel size (2967×5865 pixels scanned at 100 kHz, with 20× 0.95-NA objective lens and 50 mW excitation at 860 nm, in a coronal fixed section). Intrinsic 2PEF signals (E700sp and GG455 filters, Chroma) arises from various cellular chromophores in the tubules and the collecting ducts, and SHG signals (E700sp and HQ430/20 filters, Chroma) map the distribution of fibrosis. The insets show the various distributions of collagen fibers scored in Table 1.

Figure 11 : Image multiphotonique (2PEF/SHG) sans marquage d'un rein fibrosé de souris. **Rouge** : 2PEF endogène provenant des fluorophores contenu dans les tubules ; **Vert** : SHG provenant des fibres de collagène de type I présentent autour des artères ainsi que lors de fibrose [Strupler 07].

L'imagerie multiphotonique peut aussi être appliquée au dépistage du cancer et de la fibrose du poumon en visualisant séparément les altérations morphologiques du réseau d'élastine pulmonaire en 2PEF et la disposition anormale des fibres de collagène en SHG de la matrice extracellulaire [Hompland 08].

b. Microscopie multiphotonique in vivo in situ

Il faut savoir que plus le diagnostic d'une maladie est réalisé tôt, plus cette maladie aura des chances d'être traitée. Pour cela, le développement de dispositifs d'imagerie permettant une observation *in vivo in situ* est essentiel. Les réglementations en vigueur limitent l'utilisation des marqueurs exogène sur l'homme. Il faut donc exploiter au maximum les réponses endogènes. C'est dans cet objectif que l'imagerie multiphotonique présente un intérêt dans l'imagerie clinique. A titre d'exemple, le dispositif commercial DermaInspect est développé pour le dépistage de cancer de la peau in vivo in situ directement sur le patient [JenLab, König 02, 03]. Cet appareil est un microscope de table possédant une tête d'imagerie articulée lui autorisant une plus grande maniabilité. Il permet grâce aux réponses des différents constituants de la peau en

2PEF et SHG de visualiser les désorganisations dermatologiques ainsi que les mélanomes avec une résolution submicronique.

2. Recherche en biologie

En ce qui concerne la biologie, l'imagerie multiphotonique est présente dans différents axes de recherches que je vais décrire brièvement.

a. Embryologie

L'association des différentes modalités que sont la 2PEF, la SHG et la THG a permis la réalisation d'images montrant le développement d'un embryon de poisson zèbre (Figure 12) [Luengo-Oroz 12, Olivier 10]. La fluorescence à 2 photons montre les chromosomes (support de l'information génétique) marqués génétiquement. La génération de second harmonique révèle les fuseaux mitotiques, en grande partie formés de microtubules, qui permettent la bonne séparation des chromosomes intervenant lors de la division cellulaire. La génération de troisième harmonique s'intéresse aux membranes cellulaires et nucléaires.

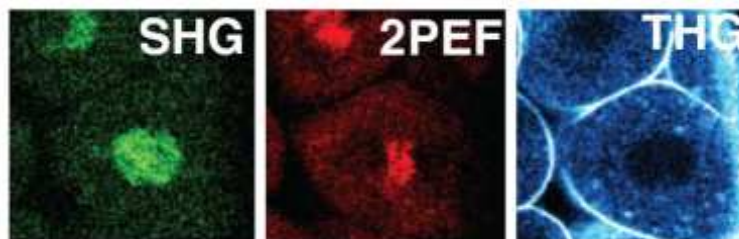


Fig. 2. Detail of THG-SHG-2PEF microscopy experiment in nuclei-stained zebrafish mutants showing a dividing cell. SHG reveals the unstained mitotic spindles. 2PEF reveals the mCherry-labeled chromatin. THG reveals the unstained cell contours.

Figure 12 : Image multiphotonique (2PEF/SHG/THG) montrant la division cellulaire d'un embryon de poisson zèbre [Luengo-Oroz 12]

b. Etude de moyens thérapeutiques

Les études concernant des pathologies telles que les cancers, les fibroses, l'amylose, ont pour but la compréhension de leurs origines, de leurs développements, ainsi que de la mise en place de moyens de traitement. Ces études sont habituellement effectuées sur le petit animal tel que la souris, et pourront possiblement dans le futur être transposées à l'homme. La fibrose rénale qui correspond à un dépôt anormal de fibre de collagène dans les reins, est une des maladies étudiées chez la souris (voir Chapitre 1 : II. 1. a.) [Strupler 07, 08]. Certaines études

utilisent les MPMs pour le suivi du métabolisme des cellules, dont les cellules cancéreuses, au travers de l'imagerie et de la quantification du NADH [Jyothikumar 13, Yu 09].

c. Neurosciences

Le domaine des neurosciences est très vaste car il regroupe entre autres les études sur le fonctionnement du cerveau ainsi que les recherches sur certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Charcot, la maladie d'Huntington ainsi que la maladie d'Alzheimer. Pour cette dernière, plusieurs travaux concernent l'étude par MPM des dépôts amyloïdes dans le cerveau qui sont liés à la maladie (Figure 13) [Burgold 11, Christie 01, Kwan 09, McCarter 13].

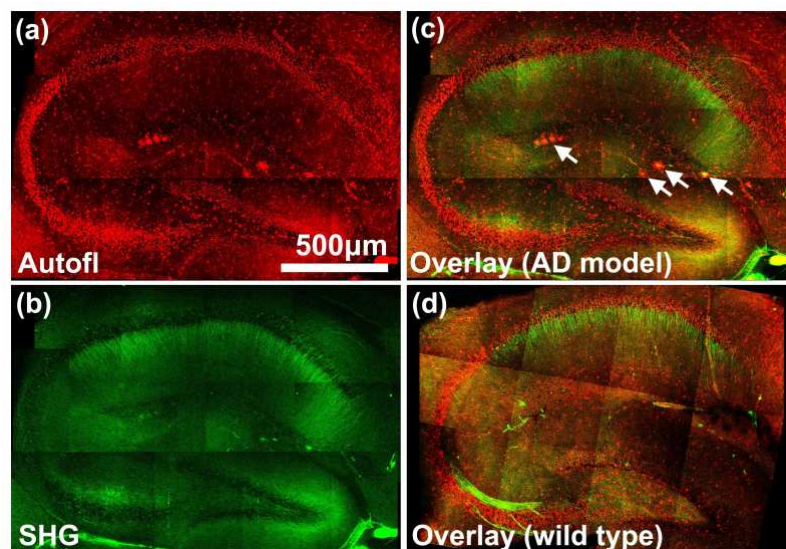


Fig. 1. Autofluorescence and second harmonic emissions from acute hippocampal brain slice of transgenic Alzheimer's disease mouse models. (a) Autofluorescence, (b) second harmonic emissions, (c) and their overlay of the hippocampus of a 17-month old APPSwe/TauJNPL3 mouse. Senile plaques emit autofluorescence (white arrows) that were morphologically distinct from other sources of intrinsic emissions and were missing from wild-type animals, as shown in (d). Each panel is a mosaic of z-projections of a 50µm thick image stack acquired in 10µm steps. Multiphoton excitation wavelength = 774nm, circular polarization.

Figure 13 : Image multiphotonique (2PEF/SHG) d'une coupe de cerveau de souris atteinte de la maladie d'Alzheimer [Kwan 09].

III. Intérêt potentiel de l'imagerie multiphotonique par fibre optique

Comme cela vient d'être décrit dans la partie précédente, les microscopies multiphotoniques ont un très fort potentiel en tant qu'outil de diagnostic. Cependant elles sont actuellement cantonnées à l'étude de biopsies [Strupler 07] ou bien à l'examen de partie du corps facilement accessible [JenLab]. Leur extension à l'imagerie par fibre optique pourrait ouvrir la voie à une

multitude de nouvelles applications dans le domaine biomédical. Nous allons maintenant tenter de visualiser et de justifier pour les différents domaines précédemment évoqués une partie de ces possibilités.

1. En clinique humaine

a. Inconvénients liés à la réalisation de biopsies ex-vivo

Dans le domaine clinique, la plupart des observations requièrent le prélèvement d'échantillons. Ce type d'analyse qui est universellement reconnue dans le secteur clinique présente toutefois d'importants inconvénients. La réalisation d'une biopsie n'est pas une opération anodine et elle peut présenter des complications et des limitations :

- Dans le cas d'une lésion bénigne chronique, le traumatisme présenté par l'acte lui-même peut transformer la dite lésion en cancer. Une biopsie peut de plus accélérer l'évolution d'une tumeur, surtout dans le cas des tumeurs vasculaires. Une coupure des vaisseaux sanguins est souvent produite lors de la biopsie, ce qui entraîne un risque de dissémination des cellules malades et donc favorise l'apparition de métastases.
- Lors du prélèvement, il est possible que des vaisseaux sanguins ou un organe voisin soient blessés et non traités suffisamment tôt, entraînant alors une hémorragie.
- La biopsie peut conduire à la déformation des tissus environnants. Ceci a pour effet de fausser et de gêner le choix du traitement proposé par le praticien.
- La biopsie n'est pas une fin en soi. Il est nécessaire que les anatomopathologistes traitent (découpe pour la réalisation de lame, marquage, analyse sous microscope) et étudient les tissus prélevés. Cela requière parfois des délais importants qui se chiffrent en journées.
- Les techniques de marquage et de fixation peuvent altérer de façon significative l'échantillon et ainsi biaiser l'analyse effectuée.

b. Exemples de solution pour le diagnostic optique in vivo in situ

C'est dans l'objectif de corriger ces problèmes que de plus en plus de travaux sont réalisés dans le domaine de l'instrumentation optique. On peut par exemple citer à nouveau le

JenLab qui, après avoir développé le DermaInspect, a développé le 2P-Microendoscope [JenLab 12] qui est un microscope équipé d'une lentille grin longue et de petit diamètre. Celle-ci joue le rôle de prolongateur du microscope multiphotonique, permettant ainsi de réduire la taille de la tête d'imagerie. Ce dispositif a déjà été utilisé dans le cadre de recherche sur le petit animal. Il a permis l'acquisition de section optique d'un œil de porc et de souris ainsi que de tissus internes tels que le foie, l'intestin et le cerveau de souris. En outre, des études cliniques ont été menées sur des patients souffrant de douleurs chroniques aiguës.

Cependant ce dispositif, malgré un apport certain, présente une importante limitation. La lentille grin proposée ne mesurant que 20 mm de long, les utilisations se réduisent à des observations proches de la surface de la peau.

Afin d'éviter cela, l'utilisation d'un véritable endomicroscope mettant en œuvre une fibre optique souple et longue de plusieurs mètres serait beaucoup plus indiquée. Commercialement, certains microscopes endoscopiques reposent actuellement sur de la fluorescence monophotonique mais ne sont malheureusement pas compatible avec l'imagerie multiphotonique. Le plus connu est le Cellvizio qui est le produit phare de la société Mauna Kea Technologies (MKT, Paris) [Mauna Kea Technologies]. Il utilise un faisceau de 30 000 fibres optiques indépendantes, d'un diamètre de l'ordre du millimètre et d'une longueur de 3 mètres environ. Toutefois celui-ci ne présente pas les avantages de l'imagerie multiphotonique évoqués précédemment tel que la profondeur de pénétration permise par l'IR, ainsi que l'utilisation de nouveau contraste (SHG). Plus de détails seront apportés sur l'utilisation d'un faisceau de fibre dans le chapitre 2.

2. En recherche en biologie

a. Etude du développement d'une pathologie

Ici aussi l'utilisation d'un microscope en ex vivo présente certaines contraintes. Par exemple pour l'étude du développement d'une tumeur, des cellules tumorales provenant d'un patient humain sont injectées dans plusieurs souris. Une fois les cellules greffées dans les souris, il est possible d'étudier le développement de la tumeur. Pour l'observation de la zone infectée, il est généralement effectué un prélèvement de tissu après euthanasie de l'animal. L'observation du développement d'une tumeur doit donc être réalisée sur différentes souris, à différents stades d'évolution. Il faut donc recourir à un très grand nombre d'animaux et aussi réussir à faire le

lien entre les différents stades d'évolution ce qui peut être difficile puisque les observations sont faites sur des animaux différents.

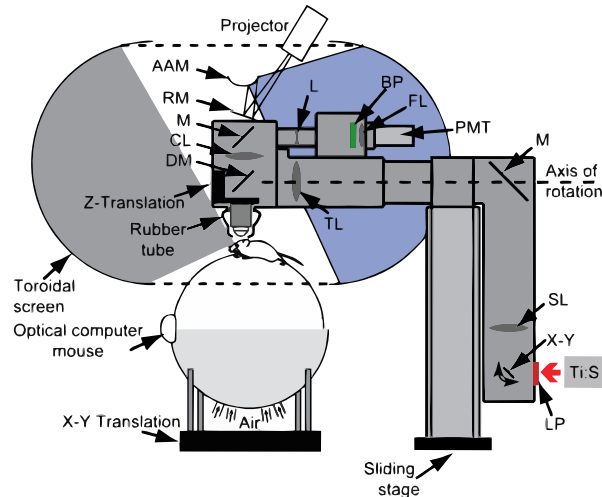
Lors de certaines études il est intéressant de visualiser le NADH qui traduit le métabolisme cellulaire [Jyothikumar 13, Yu 09]. Or le NADH n'est présent que dans les cellules vivantes. Lorsque l'on réalise une biopsie, les cellules meurent, le NADH s'oxyde et est détruit.

L'association de l'imagerie multiphotonique et de l'imagerie fibrée présente donc un grand intérêt pour ces études, car elle permettait l'observation des cellules in vivo in situ dans des conditions de vie normales.

b. Neurosciences

En neurosciences, il est utile d'effectuer des observations en profondeur dans les tissus cérébraux. Pour cela l'imagerie multiphotonique est toute indiquée. Mais ces techniques se limitant pour l'instant à la microscopie de table, les études neurologiques sont classiquement effectuées sur des souris immobilisées et/ou légèrement anesthésiées. Les différentes études possibles se réduisent alors à l'utilisation de stimuli particuliers tel que le stimulus olfactif. Dans ce domaine, plusieurs développements instrumentaux ont été proposés dont voici ci-dessous quelques exemples.

Daniel A. Dombeck [Dombeck 10] propose de fixer la tête de la souris sous un microscope, en laissant le reste de son corps mobile. L'animal est posé sur une sphère mobile en rotation qui a un rôle de « joystick » pour le déplacement dans un monde virtuel qui est projeté sur des écrans autour de la souris (Figure 14). Lorsque la souris se déplace, la sphère sur laquelle elle est posée tourne, et le décor autour de la souris évolue en conséquence. La tête de la souris étant suffisamment fixée, la zone du cerveau qui est observé ne bouge pas devant l'objectif du microscope.



Experimental setup. a. The experimental apparatus consisting of a spherical treadmill, a virtual reality apparatus (projector, RM: reflecting mirror, AAM: angular amplification mirror, toroidal screen and an optical computer mouse to record ball rotation) and a custom two-photon microscope (Ti:S: titanium:sapphire laser, LP: long pass filter, X-Y: galvanometers, SL: scan lens, M: mirror, TL: tube lens, DM: dichroic mirror, CL: collection lens, L: biconcave lens, BP: bandpass filter, FL: focusing lens, PMT: photomultiplier tube, Sliding stage: used to move microscope for treadmill access, X-Y translation: moves treadmill and mouse, Z-translation: objective focus control, Rubber tube (shown in cross-section): for light shielding).

Figure 14 : Microscope multiphotonique permettant une navigation virtuelle de l'animal étudié [Dombeck 10].

Il est alors possible d'utiliser les différentes modalités d'imagerie proposées par le microscope multiphotonique. Malgré une amélioration des conditions comportementales en comparaison avec l'immobilisation totale de la souris, celle-ci est tout de même fermement maintenue et voit ses mouvements limités. De plus la mise en place du dispositif (fixation de la souris, mise en place du système de réalité virtuelle...) est complexe.

Les progrès en électronique, en micro-optique et en micro-usinage qui ont eu lieu ces dernières années ont permis la fabrication et l'assemblage de divers composants miniaturisés tel que des caméras, des lentilles, des miroirs, des filtres. Cela a rendu possible la réalisation de microscope de fluorescence non confocaux miniatures très légers (Figure 15) [Ghosh 11]. Dans ce cas tout le microscope est porté par la souris. Ce type de dispositif peut présenter des caractéristiques très intéressantes telles qu'un poids faible (1.9 g) pour réduire les contraintes subies par la souris, un grand nombre d'images par seconde afin de visualiser les processus cérébraux rapides. On se limite ici à des observations en surface des tissus et avec marquage.

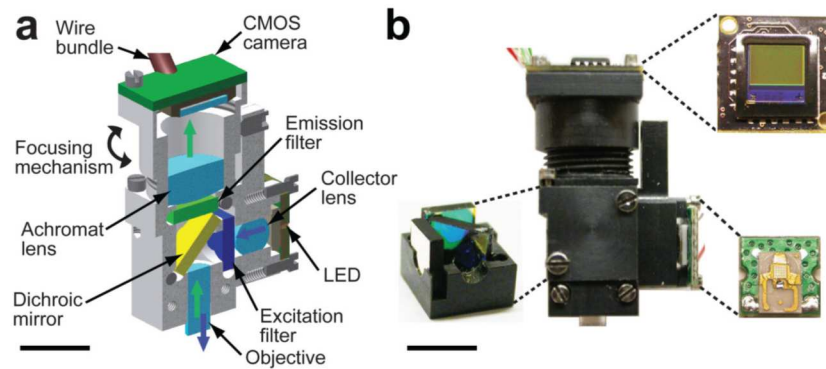


Figure 15 : Microscope de fluorescence non confocal miniature. Barre d'échelle : 5 mm
[Ghosh 11]

L'utilisation d'un faisceau de fibres [Flusberg 08, Mauna Kea Technologies, Murayama 07] entre le microscope et la souris est un autre moyen d'accroître la liberté de la souris. En contrepartie, la résolution de l'image étant fixée par l'espacement entre les fibres du faisceau, celle-ci est fortement réduite en comparaison des appareils précédemment évoqués. A l'aide de ce type de dispositif, il est alors possible d'observer l'activité cérébrale de la souris en utilisant la réponse en fluorescence de marqueurs exogènes. L'utilisation de faisceaux de fibres se limitant à l'imagerie de fluorescence linéaire, il en résulte une observation en surface. Je reviendrai plus en détails sur cette solution au chapitre suivant (voir Chapitre 2 : I. 2. a.).

La microscopie multiphotonique par fibre optique présente un grand intérêt car elle permettrait de lever la plupart des limitations évoquées ci-dessus.

IV. Cahier des charges de l'appareil visé par la présente étude :

Le développement d'un dispositif de microscopie multiphotonique fibrée est d'une grande importance comme nous venons de le voir. Le but de cette thèse est de développer un dispositif opérationnel pour la microscopie multiphotonique fibrée ayant des caractéristiques proches de celles d'un microscope multiphotonique de table, c'est-à-dire un appareil permettant l'obtention :

- d'un champ de vue important ($> 200 \mu\text{m}$)
- d'une résolution sub-micrométrique
- des réponses de 2PEF et SHG en simultané

En outre, afin d'être compatible avec les contraintes imposées par un usage en clinique humaine ou en recherche en biologie (imagerie du petit animal), cet appareil devra être associé à :

- une durée d'impulsion IR excitatrice inférieure à 100 fs : afin d'augmenter la réponse non linéaire produite.
- une puissance moyenne faible ($< 30 \text{ mW}$) : afin de ne pas détruire les tissus observés.
- l'usage de réponses endogènes.
- une fibre optique d'au moins trois mètres de long : pour assurer une maniabilité maximale au dispositif.
- un nombre d'image par seconde important ($> 8 \text{ images/s}$) : afin de permettre l'imagerie de cible mobile (battement de cœur, respiration).
- des tensions électriques d'alimentation faibles (environ une dizaine de volts) : pour éviter les risques d'électrocution.
- un dispositif miniaturisé de diamètre inférieur à 2,5 mm : pour pouvoir être introduit dans le canal opérateur d'un endoscope chirurgical.
- un dispositif léger ($< 2 \text{ g}$) : afin de pouvoir être appliqué à l'imagerie du petit animal.
- un dispositif d'imagerie stable et fiable : pour rendre possible des observations longues et répétées.

En outre l'appareil devra être constitué de l'assemblage de composants commerciaux sans étape technologique lourde de fabrication spécifique.

Nous allons voir dans le chapitre 2 l'état de l'art des dispositifs actuels répondant au moins en partie à ce cahier des charges.

Résumé chapitre 1

Ce chapitre commence par une présentation de la microscopie multiphotonique. Le principe et l'architecture d'un microscope de fluorescence à deux photons et de génération de seconde harmonique optique sont détaillés. Les avantages et les inconvénients de cet appareil sont discutés.

Vient ensuite la description d'exemples d'application innovante de la microscopie multiphotonique dans le domaine biomédical, en clinique humaine et en recherche en biologie. Grace à ces exemples on peut constater que la microscopie multiphotonique est actuellement limitée à l'observation de biopsies ex-vivo ou à celle de parties du corps humains facilement accessibles se situant sur sa surface extérieure.

Le développement d'outils pour la microscopie multiphotonique in vivo in situ permettrait de dépasser ces limitations. Des exemples de travaux de recherche ayant pour objet le développement de ce type d'instrument sont donnés et les arguments démontrant l'intérêt de moyens d'imagerie multiphotonique par fibre optique sont exposés.

Ce chapitre se termine avec la définition du cahier des charges de l'endomicroscope multiphotonique à fibre optique dont le développement est l'objet de la suite du manuscrit.

Chapitre 2 : Dispositifs pour l'imagerie non linéaire par fibre optique

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps nous intéresser aux différents éléments généralement utilisés pour la conception d'un endomicroscope multiphotonique. Nous verrons les différentes possibilités pour la source laser, la fibre optique, les moyens de précompensation de la fibre, les dispositifs d'imagerie par balayage, les micro-optiques et enfin la détection. Je finirai en abordant certains dispositifs complets présentés dans la littérature.

I. Architecture d'un endomicroscope multiphotonique

1. Le laser

Le choix du laser pour la construction d'un endomicroscope multiphotonique ne diffère pas de celui pour un microscope multiphotonique de table. Il est possible d'utiliser un laser possédant une longueur d'onde fixe, l'avantage étant alors la réduction du coût de ce dernier. Habituellement, il est toutefois préférée l'utilisation d'un laser accordable en longueur d'onde afin d'être applicable à une plus large palette de fluorophores [Stepinac 03]. Pour l'imagerie du vivant et l'exploitation de réponses endogènes, on privilégie les excitations autour de 800 nm en utilisant un oscillateur laser titane-saphir [Dhakal 13, Helmchen 13, Liang 12, Liu 13, Ouzounov 13 b]. Celui-ci permet classiquement d'obtenir des impulsions femtosecondes avec une fréquence de répétitions d'environ 80 MHz, sur une bande de longueurs d'onde réglable allant de 700 nm à 1050 nm. Il est encore possible d'élargir la bande de fonctionnement (environ de 350 nm à 2,5 μ m) en utilisant le laser pour pomper un oscillateur paramétrique optique (OPO). Cependant, la puissance moyenne disponible est alors fortement réduite passant d'environ 1 à 3W pour un oscillateur laser titane-saphir à quelques centaines de milliwatts pour un OPO. La durée des impulsions émises par le laser est un autre critère important. La durée des impulsions généralement utilisées en microscopie multiphotonique de table est usuellement égale à 100 fs. Il est possible d'accroître le niveau de signal en ayant recours à des impulsions encore plus courtes. Pour cela, il existe les oscillateurs titane-saphir ultralarge bande. Ces lasers délivrent des impulsions de durée assez couramment égale à 30 fs et pouvant même atteindre les 15fs. Ces sources d'impulsions ultra-courtes sont cependant rarement utilisées en microscopie mul-

tiphotonique car elles représentent un coût relativement plus élevé à puissance moyenne identique, et l'utilisation d'impulsions à spectre ultralarge complique la gestion de la dispersion chromatique (voir : Chapitre 2 : I. 3.).

2. La fibre optique

Dans un dispositif d'imagerie fibré, la fibre optique joue plusieurs rôles. Elle permet de transporter l'excitation IR jusqu'à l'objet imagé, mais aussi de récupérer la réponse du dit objet. Il existe toutefois certaines configurations qui utilisent un détecteur miniaturisé dans la sonde endoscopique en position distale. Ces dispositifs présentant certaines limitations d'un point de vue miniaturisation [Ghosh 11], dans les travaux qui sont présentés ici nous avons décidé de privilégier la collection de la réponse par une fibre optique avec une détection en position proximale.

En optique impulsionnelle, l'utilisation d'une fibre optique induit de nombreuses contraintes. La largeur de bande des impulsions femtosecondes se situe entre une dizaine et une centaine de nanomètres. Il découle de cela des problèmes liés à la dispersion chromatique de la fibre qui est la plupart du temps importante à 800 nm. Dans le cas d'un microscope classique (sans fibre optique), si on cumule tous les éléments traversés par le faisceau (lentilles, objectifs...), l'épaisseur de matière est faible ce qui perturbe peu les impulsions. Dans le cas d'un microscope fibré, la quantité de matière traversée est telle que l'impulsion subit des processus linéaires provoquant l'allongement de celle-ci. De plus, le confinement temporel et spatial des impulsions hautement énergétiques induit des effets non linéaires (automodulation de phase de type Kerr) ce qui accentue la déformation des impulsions. La durée des impulsions obtenues en sortie de fibre peut être alors de plusieurs dizaines de picosecondes. On évoquera des moyens de compensation de ces distorsions dans la partie suivante (voir : Chapitre 2 : I. 3.).

Nous allons maintenant présenter les différents types de fibres possibles pour la réalisation d'un endomicroscope multiphotonique.

a. Fibre multi-cœur

L'usage d'une fibre optique permet de déporter la lumière d'un point A à un point B. Pour l'imagerie, il est nécessaire d'éclairer différents points de la cible afin de former l'image. Pour cela, il existe deux configurations possibles. Nous pouvons utiliser un système de balayage

en sortie d'une fibre optique à cœur unique, ce qui revient à alimenter un microscope à balayage par une fibre optique. C'est la configuration qui a été choisie dans le travail qui est l'objet de ce mémoire. Le deuxième choix est l'utilisation de plusieurs fibres indépendantes. Dans ce cas chaque fibre est un pixel de l'image et le système de balayage est en amont du guide d'onde. On parle de « guide d'image » jouant le rôle de « prolongateur » du microscope. Au sujet de cette configuration multifibre, on peut citer l'appareil Cellvizio produit par la société Mauna Kea Technologie (MKT) (Paris). Ainsi l'utilisation d'un faisceau de 30 000 fibres a permis l'obtention d'image de fluorescence à 1 photon *in vivo in situ*. Les faisceaux de fibres ont l'avantage de permettre une miniaturisation extrême (diamètre < 1 mm). De plus, la grande surface du faisceau de fibres pourrait être un avantage en ce qui concerne la collection de la réponse. Enfin d'un point de vue hygiène pour un usage en clinique, les guides d'image étant composés de silice, il est possible de les stériliser à haute température. A ce sujet, on peut relever l'initiative de la société Dioptik (Limoges) qui a produit des fibroscopes à usage unique.

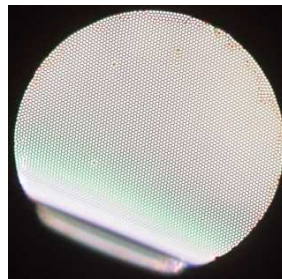


Figure 16 : Guide d'image de 30 000 cœurs ayant un diamètre total de 0.8 mm.

Toutefois, les faisceaux de fibres présentent certains inconvénients. Chaque cœur correspondant à un pixel de l'image, l'espacement entre chacun limite la résolution. Il faut donc rapprocher les cœurs les uns des autres et utiliser un faisceau de fibres dense. Ce faisant, il est nécessaire de les isoler les uns des autres. Pour cela, les faisceaux de fibres utilisés en endomicroscopie de fluorescence à 1 photon doivent être constitués de cœurs inhomogènes (Figure 17) ce qui permet de réduire les couplages inter-cœur.



Figure 17 : Inhomogénéité d'un guide d'image multi-cœur.

L'utilisation de ce type de fibre pour l'imagerie multiphotonique qui a été le sujet de plusieurs études préliminaires antérieures [Ducourthial 13, Göbel 04 b, Lelek 06, 07, Suran 09] est une solution pertinente à plusieurs points de vue mais l'inhomogénéité des guides d'image reste problématique.

Concernant l'imagerie par guide multi-cœur, on peut aussi citer deux démonstrations de principe dans lesquelles les cœurs ne sont pas directement reliés aux pixels de l'image. La première consiste en l'association d'une mise en forme spatiale du front d'onde incident en position proximale et d'un faisceau de fibres présentant des couplages inter-cœur. Dans ce cas la lumière excitatrice voyage dans plusieurs cœurs, dans le but de réduire les effets non linéaires, avant de se coupler sur un unique cœur en sortie de fibre. Un changement de loi de phase en position proximale permet de changer de position en distal ce qui assure le balayage de la cible à imager [Suran 09]. En l'absence de couplage entre les cœurs du faisceau de fibres, il est également possible, toujours en réalisant la mise en forme du front d'onde incident, d'imposer une relation de phase entre les cœurs permettant d'obtenir une imagerie sans lentille en bout du faisceau de fibre [Andresen 13].

Cependant, le design actuel de ces fibres multi-cœurs induit énormément de problèmes pour le déport des impulsions qui sont la base de l'imagerie multiphotonique. Tous les cœurs étant très différents les uns des autres, la dispersion et la biréfringence de chacun d'eux le sont aussi. Il n'a pas actuellement été trouvé de solution efficace pour l'acheminement des impulsions avec ce type de composant avec lequel la collection peut également être problématique. Cette architecture multi-cœur a ainsi été délaissée au profit d'un système d'imagerie à fibre unique que nous allons maintenant aborder.

b. Fibre à cœur unique à double gaine (en anglais : Double Clad Fiber, DCF)

En imagerie multiphotonique, les signaux générés étant relativement faibles, il faut maximiser leur collection. Pour cela, il est possible d'ajouter autour du cœur monomode de la fibre servant à acheminer l'excitation une gaine collectrice multimode de surface importante et de forte ouverture numérique. La réponse peut alors être collectée par le cœur central ainsi que sa gaine qui joue le rôle de 2^{ème} cœur. On appelle cela une fibre double gaine.

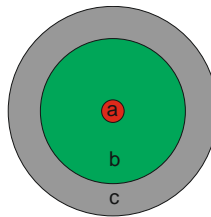


Figure 18 : Représentation d'une fibre à double gaine ; (a) : cœur monomode excitateur pour l'infrarouge ; (b) : première gaine collectrice multimode pour le visible ; (c) : seconde gaine.

Ces fibres ont été développées pour le domaine de l'amplification laser. Elles sont maintenant de plus en plus utilisées en biophotonique pour l'endomicroscopie. Il existe deux grandes familles de fibre double gaine que je vais maintenant décrire.

i. Fibre à double gaine en silice dopée

La plus ancienne famille de fibre DC repose sur le principe du guidage par réflexion totale interne grâce à l'association de trois couches possédant chacune un indice différent : un cœur central en silice dopée d'indice haut, une première gaine en silice non dopée, et enfin une seconde gaine en polymère d'indice bas. Une autre configuration consiste à avoir un cœur central non dopé entouré d'une gaine en silice dopée d'indice abaissé mais d'indice plus haut que le polymère de la deuxième gaine. Ces différents indices de la silice sont obtenus à l'aide de dopages au dioxyde de germanium ou à l'oxyde d'aluminium afin d'augmenter la valeur de l'indice de réfraction, et au fluore ou au trioxyde de bore afin de la diminuer [RP Photonics].

Les fibres commerciales (Fibercore, Liekki, Nufern, Corning, ...) généralement utilisées dans le domaine [Brown 12, Liang 12, Murari 11, Xi 12, Zhao 10] ont des caractéristiques proches de celles présentées dans la liste suivante :

- un cœur dopé de faible dimension se situant entre 4 et 10 μm , d'ouverture numérique égale à 0,1.
- une gaine collectrice de 100 μm de diamètre et d'ouverture numérique égale à 0,4.
- un diamètre total de 250 μm .

Pour une application en endomicroscopie multiphotonique, ces fibres présentent différents inconvénients. Le cœur est souvent multimode @ 800 nm (Fibercore, Nufern). Ceci conduit à un effet d'allongement d'impulsion par dispersion intermodale. Selon les dopants utilisés pour modifier la valeur de l'indice de réfraction des différentes couches, la fibre peut présenter une certaine auto-fluorescence [Chang 08, Peyrot 12, Zhao 10], qui se superposera à la réponse que l'on souhaite détecter. Afin d'éviter ce problème d'auto-fluorescence du cœur central, il a été évoqué la possibilité de réaliser une fibre ayant un cœur central non dopé et une gaine bas indice dopée fluor (fabrication Corning) [Liang 13]. Cette solution entraîne un coup important de la fibre et des risques de fluorescence de la gaine lors de la collection des réponses SHG et de 2PEF courtes longueurs d'onde.

ii. Fibre à double gaine à microstructure air-silice non dopée

• Fibre à cœur central plein à réflexion totale :

Pour corriger plusieurs des problèmes évoqués ci-dessus, il est possible d'avoir recourt à un deuxième type de fibres à double gaine incluant une microstructure air-silice sans dopants [Bjarklev 03, Broeng 99, Russell 03, 06]. Les fibres à double gaine microstructurées air-silice sont constituées d'un cœur de silice pure entouré d'une gaine collectrice microstructurée air-silice à faible fraction d'air, puis d'une couronne d'air à très faible fraction de silice maintenue à l'aide d'un manchon de silice pure (Figure 19). La gaine microstructurée est formée de silice non dopée et de trous d'air dans sa partie centrale servant à abaisser la valeur de son indice effectif. L'excitation IR est guidée comme précédemment dans le cœur central monomode grâce au saut d'indice présent entre le cœur central et la microstructure. La première gaine collectrice guide le signal courte longueur d'onde venant de la cible biologique par réflexion totale sur la couronne d'air externe (Figure 19 c) à forte fraction d'air d'indice effectif très bas. Notons que la lumière entrant dans la fibre par un trou d'air n'est pas guidée.

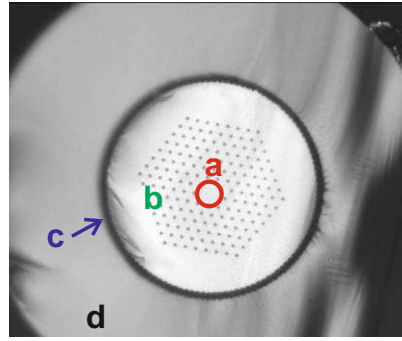


Figure 19 : Image en microscopie électronique à balayage d'une fibre double gaine microstructurée air –silice commerciale (DC 165-16-Passive, NKT Photonics) ; (a) : cœur monomode plein en silice pure non dopée ; (b) : gaine collectrice microstructurée air-silice multimode ; (c) : couronne d'air ; (d) : manchon en silice pure.

Ces fibres sont commercialement développées surtout pour le domaine des lasers de puissances. En effet, elles ont généralement une grande aire modale (en anglais : Large Mode Area, LMA) permettant de réduire les effets non-linéaires. Cette caractéristique est obtenue grâce à l'utilisation d'un saut d'indice faible entre le cœur monomode et la gaine microstructurée. En contrepartie, ces fibres sont plus sensibles aux courbures.

Elles présentent usuellement les caractéristiques suivantes :

- un cœur central monomode de silice pure de diamètre supérieur à $10\text{ }\mu\text{m}$ et de faible ouverture numérique ($< 0,1$).
- une gaine collectrice de diamètre important (environ $150\text{ }\mu\text{m}$) et de forte ouverture numérique ($> 0,4$).
- un diamètre total du manchon supérieur à $350\text{ }\mu\text{m}$.

Plusieurs groupes de recherche ont adopté ce type de fibre pour leur endomicroscope multiphotonique [Bao 10 b, Bigot 07, Ducourthial 13, Flusberg 05, Zhao 10]. Elles permettent de guider la lumière sans utiliser de dopant éliminant donc tout risque d'auto-fluorescence. De plus ces fibres présentent des cœurs de grosse taille permettant de limiter les effets non linéaires. En contrepartie, pour obtenir une résolution d'imagerie correcte, il est nécessaire de les associer à un système optique imageur présentant un très faible grandissement ($\ll 1$) de dimension longitudinale généralement importante. Il est alors impossible de concilier une forte miniaturisation de la sonde distale et une résolution submicronique.

- **Fibre à cœur central creux à effet de cristal photonique :**

Afin de réduire les contraintes associées au déport d'impulsions ultra-courtes et intenses par fibre optique, notamment celles dues à la présence d'effets non-linéaires dans le cœur central, un fort intérêt s'est porté sur les fibres à cœur creux (en anglais : Hollow Core Photonic Crystal Fiber, HC-PCF) (Figure 20) [Bigot 07, Göbel 04]. Contrairement aux fibres classiques, les fibres à cœur central creux n'utilisent pas le principe de réflexion totale. A l'aide d'une structure d'indice périodique en 3D, il est possible de confiner un mode spatial dans le cœur creux d'une fibre grâce au phénomène de bande photonique interdite dans la gaine [Russell 92].

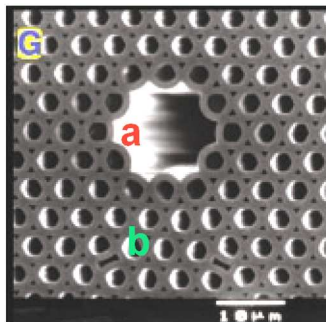


Figure 20 : Image en microscopie électronique à balayage (MEB) de la partie centrale d'une fibre à cœur creux ; (a) : cœur ; (b) : cristal photonique [Russell 03].

Ce type de fibre optique présente deux gros avantages. Elles permettent d'éliminer la présence d'effets non linéaires. De plus, au centre de la bande de guidage, la dispersion d'ordre 2 est nulle. Ces fibres sont très utilisées dans le domaine des lasers de puissance afin de déporter un faisceau puissant. Néanmoins, les fibres à cœur creux présentent quelques problèmes. En effet la dispersion augmente très vite lorsque l'on s'écarte du centre de la bande de guidage (Figure 21). Or les impulsions utilisées possèdent un spectre large d'au moins une dizaine de nanomètres ce qui peut conduire à une forte dispersion d'ordre 3 de nature à déformer les impulsions. De plus on peut voir sur la Figure 21 que la bande de guidage est étroite (< 100 nm).

Typical attenuation and dispersion

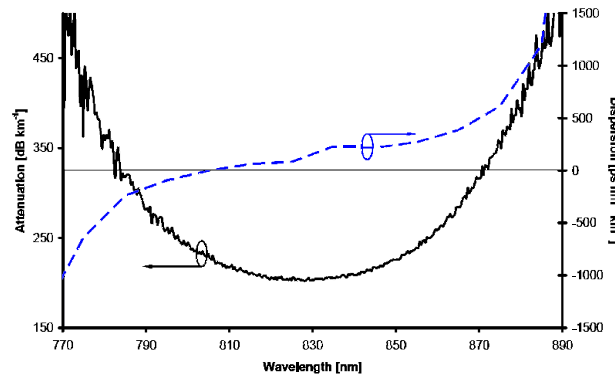


Figure 21 : Atténuation et dispersion d'une fibre à cœur creux commerciale (HC800-01, NKT Photonics)

Afin d'atténuer ces inconvénients, les longueurs de fibres utilisées pour la réalisation d'endomicroscope multiphotonique sont inférieures au mètre [Engelbrecht 08, Le Harzic 08]. Enfin, elles possèdent un cœur de grandes dimensions limitant la résolution. En microscopie multiphotonique, il est la plupart du temps nécessaire de modifier la longueur d'onde d'excitation afin de s'adapter à la bande d'absorption de l'échantillon observé. Cependant, les fibres à cœur creux possèdent une bande de transmission relativement étroite ne permettant pas d'ajuster la longueur d'onde d'excitation (Figure 21). Une nouvelle géométrie de fibre à cœur creux à gaine à microstructure dite Kagomé [Emaury 13] permet semble-t-il de réduire en partie ces inconvénients grâce à l'augmentation de la largeur de la bande de guidage du cœur central ainsi qu'à la réduction de la dispersion et des pertes dans la bande. Néanmoins, ces fibres présentent toujours un cœur de grande dimension limitant la résolution.

En ce qui concerne la collection de la réponse non linéaire venant de l'échantillon biologique, il est impossible d'avoir recourt au cœur central de la fibre car la réponse est en dehors de la bande de guidage admise par celle-ci. Comme on l'a déjà évoqué précédemment, nous souhaitons collecter la réponse par une fibre optique afin de minimiser la taille de la sonde. Pour cela il existe différentes solutions. Il est possible d'orienter la réponse non linéaire vers une autre fibre collectrice à l'aide d'un miroir dichroïque miniature se trouvant en position distale [Engelbrecht 08, Le Harzic 08, Piyawattanametha 09]. L'efficacité de collection est importante mais la miniaturisation requière d'importants efforts technologiques.

Il a été montré qu'il était possible de placer une couronne de fibres collectrices plastiques multimodes à forte ouverture numérique autour de la fibre excitatrice [Ouzounov 13 b].

Il faut également citer le développement de fibre à cœur creux et à double gaine [Brustlein 11]. Nous retrouvons sur la Figure 22 comme précédemment le cœur creux de la fibre (a) et sa microstructure photonique (b) qui permet d'acheminer l'excitation grâce au phénomène de bande interdite. Puis nous avons en périphérie une gaine collectrice multimode en silice pure (c) permettant d'acheminer la réponse en retour par réflexion totale sur la couronne d'air l'entourant (d) et enfin un manchon de silice permettant de maintenir la structure (e). Il subsiste toujours certaines limitations notamment du point de vue de la collection. Les fibres à gros cœur nécessitent l'utilisation de micro-optique ayant un grandissement suffisamment petit ($\ll 1$) afin d'obtenir une résolution satisfaisante. Or ce grandissement est aussi appliqué à la gaine collectrice, cela revenant à réduire la surface de collection. De plus, le cœur central et sa microstructure ne participent pas à la collection, la collection s'effectuant ainsi loin de l'axe optique.

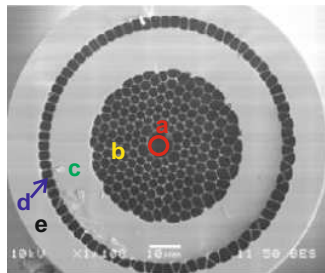


Figure 22 : Image en microscopie électronique à balayage d'une fibre double gaine à cœur creux [Brustlein 11] ; (a) : cœur central monomode creux ; (b) : microstructure air-silice ; (c) : gaine collectrice multimode en silice pure non dopée ; (d) : couronne d'air ; (e) : manchon.

Les fibres à cœur creux présentent des avantages concernant le déport d'impulsions (faible dispersion du 2^{ème} ordre, pas d'effet non-linéaire). Mais des limitations sont encore présentes (atténuation pouvant être forte, dispersion du 3^{ème} ordre, très faible accordabilité, gros cœur limitant la résolution, collection hors axe optique avec une surface réduite).

Comme nous le verrons par la suite, nous avons finalement décidé de travailler avec une fibre à double gaine microstructurée air-silice à cœur plein. Dans ce cas les effets de dispersion et de non linéarité dans la fibre sont incontournables. Nous allons maintenant voir les moyens de précompensation permettant d'acheminer des impulsions femtosecondes ultra-courtes et intenses grâce à ce type de fibre optique.

3. Moyens de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre endoscopique

a. Effets linéaires

i. Dispersion chromatique

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à l'effet linéaire de dispersion chromatique. Celle-ci est due à la variation de l'indice effectif de la fibre aux ordres 2 et supérieurs en fonction de la longueur d'onde [Agrawal 01, Lelek 06]. Dans l'immédiat nous ne parlerons que l'ordre 2 qui correspond à la dispersion de vitesse de groupe. Les ordres supérieurs n'interviennent en effet que dans le cas où l'ordre deux est annulé. Les différents paquets de longueurs d'onde composant le spectre de l'impulsion ne voyagent pas à la même vitesse de groupe dans la fibre optique, ce qui conduit à un étalement temporel des impulsions. La durée de l'impulsion Δt_f à la sortie dépend de la longueur de fibre parcourue L , du coefficient de dispersion d'ordre 2 de la fibre, noté D , ainsi que de la largeur spectrale $\Delta\lambda$ de l'impulsion, de telle sorte qu'en régime de forte dispersion on a :

$$\Delta t_f \approx \Delta\lambda L D \quad (1.4)$$

Dans le cas d'une fibre monomode standard, $D \approx 120 \text{ fs}/(\text{nm.m})$ à $\lambda = 800 \text{ nm}$. La formule (1.4) est valable uniquement dans l'hypothèse d'une dispersion forte telle que celle rencontrée lorsque la longueur de fibre utilisée dépasse la longueur caractéristique de dispersion de la fibre L_d (longueur correspondant à l'allongement de l'impulsion d'un facteur $\sqrt{2}$) :

$$L_d = \frac{\pi c}{2 \ln(2) \lambda^2 D} \Delta t_i^2 \quad (1.5)$$

Pour une impulsion gaussienne de durée initiale $\Delta t_i = 100 \text{ fs}$ à mi-hauteur en intensité, à $\lambda = 800 \text{ nm}$, pour une fibre monomode standard à 800 nm , L_d est égale à 9 cm . Ainsi lors du développement d'un endomicroscope à l'aide d'une fibre optique de plusieurs mètres, l'effet de la dispersion est inévitable. Par exemple pour des impulsions de 100 fs et de 10 nm de bande à 800 nm , on obtient au bout d'une fibre optique standard longue d'un mètre, des impulsions d'environ $1,2 \text{ ps}$, ceci en absence d'effet non linéaire. Il est alors nécessaire de pré-compenser la dispersion dite normale de la fibre ($D > 0$).

Dans une fibre à dispersion normale ($D > 0$), les paquets de longueur d'onde haute (dites « rouges ») sont plus rapides que les paquets de longueur d'onde basse (dites « bleues »). Le principe des dispositifs de pré-compensation qui vont être cités ci-dessous est de mettre préalablement en forme l'impulsion en retardant les paquets rouges par rapport aux paquets bleus qui se propageront le plus rapidement dans la fibre. Ainsi, lors de la propagation, les différents paquets de fréquences vont se resynchroniser, et on peut obtenir une impulsion comprimée en sortie de fibre optique. Le dispositif de pré-compensation et la fibre endoscopique ont respectivement le rôle d'étireur (dispersion anormale) et de compresseur (dispersion normale) (Figure 23).

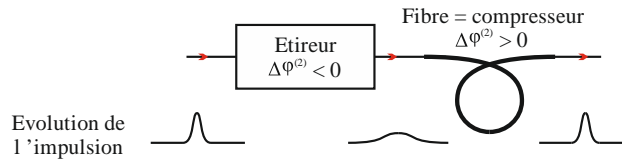


Figure 23 : Système étireur-compresseur à fibre.

L'étireur introduit alors une phase spectrale d'ordre 2, de la forme :

$$\varphi(\omega) = \varphi_2 (\omega - \omega_0)^2 \quad (1.6)$$

$\varphi_2 < 0$ s'exprime en fs^2 . Dans le cas d'une dispersion normale (compresseur), on a $\varphi_2 > 0$. La dispersion de vitesse de groupe se traduit donc par une modulation de phase spectrale parabolique $\Delta\varphi^{(2)}$ positive définie à mi-hauteur du spectre :

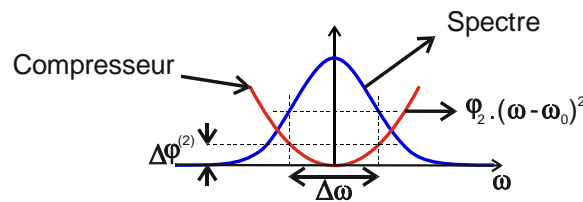


Figure 24 : Modulation de phase spectrale due à une dispersion normale.

Dans le cas où le dispositif de précompensation est bien réglé celui-ci apporte une modulation de phase spectrale opposée, de courbure tournée vers le bas, telle que :

$$\Delta\varphi_{\text{étireur}}^{(2)} = -\Delta\varphi_{\text{compresseur}}^{(2)} \quad (1.7)$$

Pour pré-compenser la dispersion présente dans une fibre optique, il existe différentes solutions. Nous allons maintenant voir certaines d'entre elles.

- **Etireur à fibre compensatrice**

Il est possible d'utiliser pour l'étireur une première fibre ayant une dispersion anormale ($D < 0$) [Wu 09]. L'association de la fibre compensatrice et de la fibre endoscopique permet d'avoir une dispersion totale égale à zéro. Pour cela, il est nécessaire de recourir à une fibre compensatrice de longueur L_c présentant une dispersion $D_c (< 0)$ et une fibre endoscopique de longueur L_e ayant une dispersion $D_e (> 0)$ telles que :

$$L_c D_c + L_e D_e = 0 \quad (1.8)$$

L'avantage principal de cette technique est la compacité et la simplicité du système tout fibré. Cependant, la dispersion dépendant de la longueur d'onde, le dispositif obtenu ne présente aucune accordabilité en longueur d'onde. De plus, à cause d'effets de dispersion différentielle d'ordre supérieur, la fibre compensatrice ne corrige pas parfaitement les déformations induites par la fibre endoscopique. Dans la publication [Wu 09] qui met en œuvre cette solution, on peut ainsi voir que la durée de l'impulsion à la sortie du compresseur est au moins deux fois supérieure (i.e. minimum 130 fs) à celle délivrée par le laser (i.e. 60 fs).

Les fibres à dispersion anormale peuvent être à cœur plein. Pour cela la fibre doit présenter un cœur de très petite dimension, ce qui la rend extrêmement non-linéaire. Il y a alors des risques de fragmentation temporelle de l'impulsion par effet soliton d'ordre supérieur, de telle sorte qu'il est alors nécessaire de limiter fortement la puissance utilisée. La fibre peut, de façon plus avantageuse, être à cœur creux ; il n'y a alors plus de problème de non-linéarité mais par contre il s'avère qu'y a beaucoup de pertes de transmission. Ainsi cette architecture a été appliquée uniquement à de faibles longueurs de fibre. A titre d'exemple, on peut citer la publication [Wu 09] où la fibre endoscopique mesure seulement 76 cm.

- **Etireur à ligne dispersive à dispersion annulée**

Une seconde solution fait appel à une ligne dispersive dite « 4 f » repliée à dispersion annulée (Figure 25). Ce dispositif permet d'afficher le spectre de l'impulsion et à appliquer une loi de phase arbitraire $\varphi(\omega)$. Cette modulation de phase spectrale peut être imposée grâce à la translation du miroir de repli, ou plus souvent par une lentille cylindrique jouant le rôle de masque de phase [Myaing 06, Rivera 11].

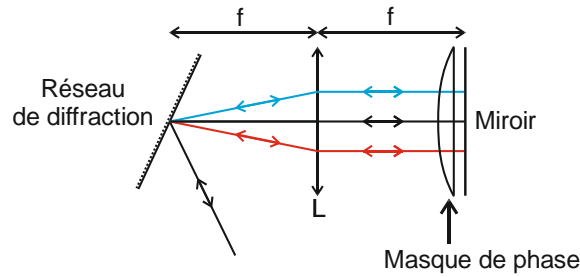


Figure 25 : Etireur à ligne dispersive $4f$ repliée

Ce dispositif de pré-compensation présente l'avantage d'être accordable. Par contre il peut être lié à des problèmes de recombinaison spatiale des composantes spectrales. En effet, appliquer une loi de phase spectrale de type parabolique à l'aide d'une lentille cylindrique s'accompagne d'un effet de dispersion spatiale (effet de prisme). Les différentes longueurs d'onde ne se présentent donc pas au retour de la même manière sur le réseau de diffraction en comparaison avec le trajet aller. Cela empêche la bonne recombinaison des composantes spectrales qui ressortent du dispositif avec une certaine dispersion spatiale transverse. Lors de l'injection dans la fibre optique endoscopique monomode, il y a alors un risque de filtrage spectral. Pour limiter cela, ce type de pré-compensation est habituellement utilisé pour des longueurs de fibre faibles inférieures au mètre.

- **Etireur à réseaux de diffraction de type Treacy**

L'une des architectures les plus utilisées pour pré-compenser la dispersion est l'étireur à réseaux de diffraction (ou « ligne Treacy ») [Treacy 69]. Celui-ci est composé d'une paire de réseaux identiques placés face à face en configuration anti-parallèle.

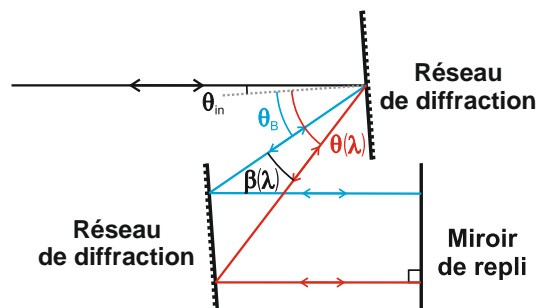


Figure 26 : Etireur à réseaux.

Grâce aux deux réseaux, le faisceau voit ses composantes spectrales se séparer spatialement. Puis à l'aide d'un miroir, les différentes longueurs d'onde du faisceau parcourent le chemin inverse et ainsi reconstituent le faisceau collimaté sans dispersion spatiale. Le passage dans

l'étireur à réseaux affecte le spectre de l'impulsion d'un terme de phase spectrale $\varphi(\lambda)$ [Lefort 12] :

$$\varphi(\lambda) = \frac{2\pi}{\lambda} d \frac{\cos(\beta(\lambda))}{\cos(\theta_B)} \quad (1.9)$$

$$\sin(\theta_{in}) + \sin(\theta(\lambda)) = k \frac{\lambda}{p} \quad (1.10)$$

avec :

- p : le pas du réseau
- k : l'ordre de diffraction utilisé
- d : la distance entre les réseaux
- θ_{in} : l'angle du faisceau sur le 1er réseau
- θ_B : l'angle de diffraction pour une longueur d'onde de référence choisie
- $\theta(\lambda)$: l'angle de diffraction pour une longueur d'onde quelconque
- $\beta(\lambda) = \theta(\lambda) - \theta_B$: déviation par rapport à la longueur d'onde de référence

Ce dispositif est très utilisé en endomicroscopie multiphotonique [Göbel 04 b, Gu 14 b, Lelek 07, Zhang 12, Zhao 10] à cause de ses nombreux avantages tels que son accordabilité. En effet, si la longueur de la fibre ou si la longueur d'onde centrale est modifiée, il est possible d'ajuster la distance d entre les réseaux qui influe sur la phase à l'ordre deux appliquée à l'impulsion. Ce dispositif est simple et possède une bonne efficacité énergétique ($> 50\%$) [Lefort 12]. Par contre l'ordre de trois de dispersion qu'il induit est problématique.

Toutefois on constate qu'il est généralement associé à de courtes longueurs de fibre inférieures au mètre et qu'il produit alors des durées d'impulsions relativement importantes (i.e. 450 fs en sortie de 0,5 m de fibre pour [Zhang 12] par exemple). Lorsque ce type de dispositif est utilisé pour compenser des fibres de longueur supérieure au mètre alors la durée d'impulsion en sortie de système étireur-compresseur à fibre se situe dans le domaine picoseconde [Bao 10], ceci pour des raisons qui seront expliquées ultérieurement.

Il existe d'autres dispositifs de pré-compensation de dispersion [Lefort 12], tels que les lignes à primes, les étireurs hybrides composés de prismes et de réseaux, ou encore les miroirs

chirpés. Mais ces dispositifs ne sont généralement pas utilisés dans le domaine de l'endoscopie multiphotonique du fait de leur faible niveau de compensation de dispersion, de leur complexité ou de leur faible efficacité énergétique.

ii. Biréfringence

Les contraintes mécaniques présentes au sein du matériau lors de la fabrication et/ou de la manipulation d'une fibre optique génèrent inévitablement une certaine biréfringence ce qui conduit à l'apparition de deux modes propres à polarisation distincts. Ces modes correspondent à deux états de polarisation rectilignes selon des axes appelés « axes neutres ». Ces deux modes présentent des vitesses de phase et de groupe différentes. L'excitation par une polarisation rectiligne en dehors des deux axes neutres a ainsi pour effet le dédoublement de l'impulsion. Cette séparation s'accompagne d'une répartition de l'intensité sur les deux impulsions. Le signal multiphotonique produit sera alors réduit d'un coefficient pouvant être aussi grand que 2.

Il existe des fibres optiques spécialement conçues afin d'accentuer cette biréfringence. Ceci a pour conséquence de réduire les couplages entre les deux modes à polarisation lors de la manipulation de la fibre. Ces fibres sont à maintien de polarisation. Ceci veut dire qu'un état de polarisation rectiligne incident parallèle à une des deux lignes neutres sortira de la fibre en étant rectiligne quelles que soient les conditions d'utilisation de la fibre.

b. Effets non-linéaires

Lorsque l'on soumet la fibre optique à un signal lumineux intense, le phénomène d'auto-modulation de phase de type effet Kerr (en anglais : self phase modulation, SPM) apparaît. Cet effet produit une variation de l'indice effectif $n(t)$:

$$n(t) = n + n_2 I(t) \quad (1.11)$$

Cet effet entraîne une automodulation de phase temporelle de l'impulsion. Dans la convention de notation des ondes en $\omega t - kz$, on a :

$$\varphi_{NL}(t) = \frac{-2\pi}{\lambda_o} n_2 I(t) L \quad (1.12)$$

λ_0 est la longueur d'onde du vide, L la longueur de la fibre, n_2 le coefficient non linéaire du matériau ($3.10^{-20} \text{m}^2/\text{W}$ pour la silice pure) et $I(t)$ est l'intensité instantanée de l'impulsion (W/m^2). L'automodulation de phase temporelle entraîne une automodulation de la fréquence instantanée :

$$f(t) = f_0 + \frac{1}{2\pi} \frac{d\varphi_{NL}(t)}{dt} \quad (1.13)$$

Cette automodulation induit le décalage du front avant de l'impulsion vers les longueurs d'onde rouges et celui du front arrière vers les longueurs d'onde bleues (Figure 27). Pour une impulsion ne présentant pas de modulation de phase, ce phénomène élargit le spectre.

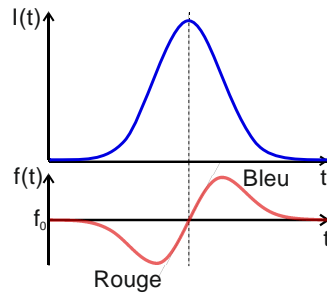


Figure 27 : Automodulation de la fréquence par effet Kerr en l'absence de dispersion ($L \ll L_d$).

Dans les conditions décrites au paragraphe i. précédent, c'est-à-dire lorsque l'on a affaire à une impulsion qui a été préalablement dispersée anormalement (paquets de fréquence bleue sur le front avant, rouge sur l'arrière) l'automodulation de phase (rouge créé à l'avant, bleu à l'arrière) a tendance à comprimer le spectre de l'impulsion. Les paquets de fréquence bleu qui se situent à l'avant de l'impulsion sont décalés vers le rouge, tandis que les paquets rouges qui sont à l'arrière sont décalés vers le bleu. Le spectre de l'impulsion tend alors vers la fréquence centrale et il se comprime. La durée des impulsions comprimées en sortie de compresseur étant inversement proportionnelle à la largeur de leur spectre, on a alors un élargissement temporel [Agrawal 01, Lefort 12, Lelek 06].

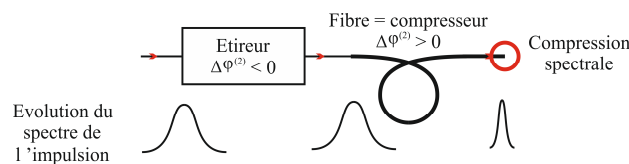


Figure 28 : Compression spectrale en sortie du système étireur-compresseur en présence d'effet Kerr ($n_2 > 0$) dans la fibre du compresseur.

Afin de mieux quantifier l'étendue de ce problème, il est possible de consulter la publication [Wu 09] qui présente l'impact de la puissance moyenne sur la durée des impulsions disponibles à la sortie de la fibre optique lorsque cette configuration étireur-compresseur est utilisée. Les impulsions passent de 130 fs pour 20 mW à 180 fs pour 70 mW dans le cas d'une fibre longue de 76 cm ayant un cœur de 3,5 μm .

Afin de limiter cet effet non-linéaire de compression spectrale, il est possible d'utiliser une fibre à large cœur (en anglais : large mode area fiber, LMA fiber) [Kalashyan 12 b, Lefort 12]. Ces fibres permettent de réduire le niveau d'intensité crête en la répartissant sur une surface plus importante. En contrepartie, dans le cadre de l'endomicroscopie, la résolution du dispositif sera impactée comme cela a été évoqué précédemment. Une solution astucieuse permettant de pré-compenser cet effet non linéaire et étant compatible avec l'usage de fibres à petit cœur sera présentée au chapitre suivant.

4. Dispositifs d'imagerie par balayage pour la microendoscopie

Le passage de la microscopie de table à l'endomicroscopie nécessite aussi la miniaturisation du dispositif de balayage nécessaire à la formation d'une image.

a. Balayage du faisceau à l'aide d'un microsystème électromécanique (MEMS)

Il est possible comme en microscopie de table d'avoir recourt à des miroirs dans l'objectif d'imposer au faisceau laser le balayage de l'échantillon (en anglais : beam scanning). La contrainte supplémentaire est de disposer d'un système de balayage miniature facilement intégrable à la sonde distale de l'endomicroscope. Pour cela, il existe des micro-systèmes électromécaniques (en anglais : Microelectromechanical systems, MEMS) équipés d'un micro-miroir mobile [Fu 06, 07, Jung 08]. Les MEMS utilisés sont le plus souvent des systèmes doublement résonnants utilisant un motif de balayage de type Lissajous (deux fréquences de résonances différentes).

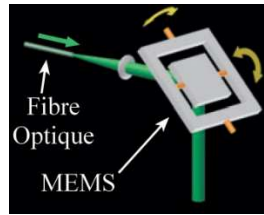


Figure 29 : MEMS [Flusberg 05]

Ces dispositifs présentent un très bon contrôle du balayage tout en fournissant un grand nombre d'images par seconde et des champs d'observation conséquents. Malgré tout, ils sont actuellement peu utilisés pour le développement d'endomicroscopes multiphotoniques, car ils présentent un bon nombre d'inconvénients tels que le coût important de ceux-ci, ou encore la forte sensibilité aux chocs électrostatiques. De plus, d'un point de vue miniaturisation, ils sont formés d'un substrat de taille millimétrique, et nécessite l'utilisation d'un second miroir de repli afin d'imager dans l'axe car ils fonctionnent à 45° comme l'indique les figures 29 et 30.

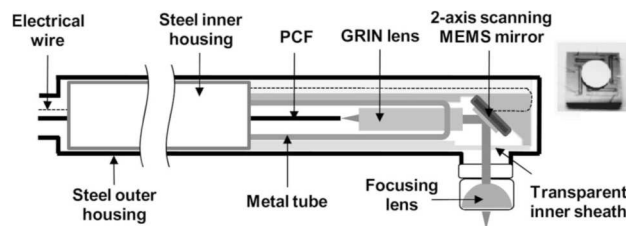


Figure 30 : Dispositif d'imagerie basé sur un MEMS ; dimensions : 1 cm de diamètre pour 14 cm de long [Jung 08].

b. Balayage de la fibre avec actuation à l'aide d'une céramique piézoélectrique

Dans le but de réduire l'encombrement du système de balayage et donc la taille de la sonde distale, il est possible grâce à une céramique piézoélectrique (en anglais : piezoelectric transducer, PZT) d'imposer le balayage de la fibre permettant ainsi le scan de l'échantillon. Le dispositif le plus simple fait appel à un actuateur piézoélectrique de forme cylindrique creux dans lequel la fibre endoscopique est fixée en laissant dépasser l'extrémité de la fibre de plusieurs millimètres (Figure 31). Comme nous le verrons au chapitre 5 c'est la solution que nous avons retenue. Avec ce dispositif il est possible grâce à la déflexion de la céramique sur deux dimensions d'obtenir le balayage 2D de la fibre. L'effet piézoélectrique est associé, pour des tensions de l'ordre du volt appliquées à une céramique monomorphe, à des déplacements sub-microniques. Il est alors nécessaire d'user d'un effet d'amplification mécanique de l'amplitude

de mouvement de la fibre optique. Pour cela, il est possible d'alimenter l'actuateur piézoélectrique à la fréquence de résonance mécanique du tronçon de fibre jouant le rôle de résonateur mécanique en forme de poutre comme un diapason.

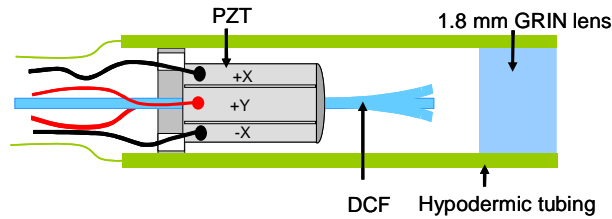


Figure 31 : Dispositif d'imagerie basé sur le balayage de l'extrémité de la fibre (DCF) sous l'action d'une céramique piézoélectrique (PZT) de forme cylindrique [Wu 09].

Cette solution est très utilisée dans le domaine de l'endomicroscopie [Aguirre 10, Brown 06, Huo 10, Xi 12, Zhang 12], du fait de la miniaturisation qu'elle permet (< 3 mm de diamètre et 25 mm de longueur rigide) [Zhang 14], et de la simplicité d'assemblage. De plus, les tensions d'alimentation peuvent être inférieures à 30 V crête à crête pour des amplitudes de balayage de bout de fibre de l'ordre du millimètre. Il est possible d'obtenir un grand nombre d'image pouvant être aussi grand que 25 images par seconde. Néanmoins, du fait de l'existence de certains couplages mécaniques, le contrôle de ce type de dispositif nécessite d'importantes optimisations. Ayant choisi cette architecture, nous verrons plus de détails sur celle-ci dans le Chapitre 5.

L'actuation de la fibre peut aussi être réalisée à l'aide de l'association de deux céramiques piézoélectriques différentes, une première faisant résonner le bras de fibre sur un axe, la seconde, de type bimorphe ou trimorphe, possédant une longue course sur le second axe et réalisant une actuation non résonnante (Figure 32) [Rivera 11]. Cette configuration permet d'obtenir un balayage similaire à celui utilisé classiquement en microscopie de table (balayage ligne / colonne ; en anglais : raster scanning), résonnant / non résonnant.

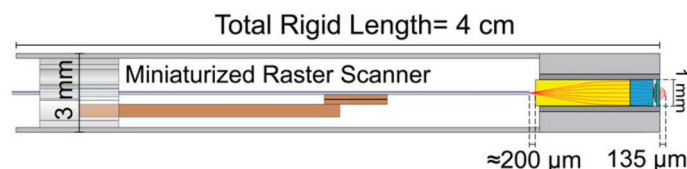


Figure 32 : Scanner à fibre optique de type résonnant / non résonnant basé sur l'emploi de deux céramiques piézoélectriques différentes [Wu 09].

Une seule équipe au monde utilise cette architecture qui se caractérise par une haute technicité, une miniaturisation modérée et un manque de degrés liberté du point de vue de la gestion des couplages mécaniques entre les deux axes d'actuation (voir chapitre 5).

Il existe d'autres types de dispositif de balayage reposant sur le déplacement d'une fibre optique. On peut citer par exemple celui qui est utilisé par l'équipe du professeur Min Gu (Swinburne, Australie) [Bao 08, Goetz 07] qui est un dispositif électromagnétique permettant un balayage résonnant / non résonnant. Ce scanner est développé par la société OptiScan (Fluorescence In Vivo Endomicroscope, FIVE1). Cependant, ce système est volumineux (diamètre = 5 mm) et lourd (poids de la sonde > 60 g), et ne répond donc pas à notre cahier des charges. On peut aussi évoquer le système développé par Jürgen Sawinski durant sa thèse [Sawinski 05, 07, 09] qui est un scanner utilisant quatre céramiques piézoélectriques multicouches longues courses afin d'obtenir un balayage de type doublement non résonnant. Néanmoins, ce dispositif présente des contraintes de miniaturisation (diamètre proche du centimètre).

5. Micro-optique

En endomicroscopie, la micro-optique sert à faire l'image de la face de sortie de la fibre sur la cible biologique à imager (Figure 33). Elle correspond à l'association d'un collimateur et d'un objectif :

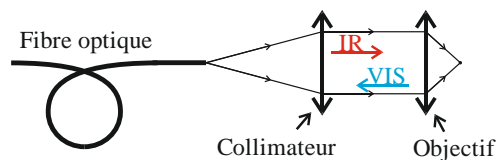


Figure 33 : Rôle de la micro-optique ; IR : Infrarouge ; VIS : Visible.

Comme en microscopie de table, l'objectif est un composant clé. En microscopie de table les objectifs utilisés sont généralement de très forte ouverture numérique et sont composés d'un grand nombre de lentilles afin de présenter peu d'aberrations, qu'elles soient chromatiques ou sphériques. En endomicroscopie, ce type d'optique est impossible à utiliser, car trop volumineuse. Il existe toutefois des micro-optiques permettant de se rapprocher des performances des objectifs présents dans les microscopes de table.

Pour cette micro-optique nous nous sommes fixé le cahier des charges suivant :

- Des dimensions réduites (diamètre et longueur) pour une bonne miniaturisation du dispositif.
- Une ouverture numérique du côté de l'objectif importante afin de maximiser la résolution et l'efficacité de collection de la réponse.
- Une distance de travail importante afin de réaliser des images en profondeur dans les tissus.
- Une bonne transmission dans le visible et dans l'infrarouge afin de maximiser l'efficacité d'excitation et de collection.
- Un faible chromatisme pour une meilleure collection de la réponse non-linéaire visible.
- Des aberrations hors-axe faibles pour éviter les distorsions de l'image et permettre un champ d'observation important.

a. Microlentilles GRIN

La miniaturisation de l'optique se trouvant à l'extrémité distale de la fibre est possible grâce à l'emploi de lentilles à gradient d'indice encore appelées lentilles grins [Fu 06, Rivera 11, Zhao 10]. Ces lentilles comme leur nom l'indiquent fonctionnent de la même manière que les fibres à gradient d'indice. Elles présentent une variation de leur indice selon la distance à l'axe permettant ainsi de guider la lumière par effet de réfraction continument variable.

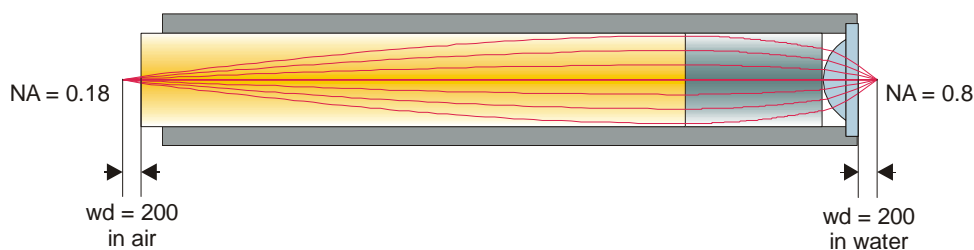


Figure 34 : lentille grin commerciale (ref. GT-MO-080-0415-810 de chez GRINTECH). La fibre endoscopique se situe à gauche de la lentille.

En endoscopie, les lentilles grins usuelles ont des diamètres d'environ 2 mm, ainsi que de forte ouverture numérique ($> 0,4$) ce qui permet une importante miniaturisation tout en permettant à première vue de collecter de façon efficace le signal visible en retour. Ces lentilles présentent des faibles grossissements (< 1) ce qui permet de focaliser efficacement sur l'échantillon et ainsi améliorer la résolution. Le fonctionnement même des optiques à gradient d'indice

induit cependant un fort chromatisme. L'endomicroscopie multiphotonique étant basé sur une réponse ayant une longueur d'onde très différente de celle de l'excitation, il résulte une grande différence de position le long de l'axe optique de point focal retour au voisinage de la fibre pouvant être de l'ordre du millimètre [Wu 10]. Cet effet est un problème lors de la collection de la réponse par la deuxième gaine de la fibre optique. En outre les lentilles grins sont souvent sensibles aux contraintes mécaniques. On peut aussi ajouter le fait que, lorsqu'elles ont une forte ouverture numérique, ces lentilles sont systématiquement associées à de faibles distances de travail (frontale $< 200 \mu\text{m}$; voir Figure 34), l'endomicroscope multiphotonique perdant alors un de ses avantages fondamentaux, à savoir la profondeur de pénétration dans les tissus.

b. Microsystème optique à doublets achromatiques

Il est possible de corriger les aberrations chromatiques en associant des matériaux présentant des variations d'indice à l'ordre deux en fonction de la longueur d'onde opposées. Selon le niveau de correction, on peut utiliser des doublets ou triplets achromatiques correspondant à l'utilisation de 2 ou 3 verres différents. Depuis quelques années, ces lentilles existent en version miniature (diamètre $< 2 \text{ mm}$) dans le commerce (exemple de fournisseur : Edmund Optics) et à bas cout (exemple : doublet achromatique de 3 mm de focale et de 2 mm de diamètre, ref. Edmund Optics #65-567, prix = 175 dollars). Les dispositifs composés de plusieurs doublets achromatiques sont de plus en plus préférés aux lentilles grins [Wu 10, Zhao 10]. Ces dispositifs présentent plusieurs avantages par rapport aux lentilles grins tel que leur achromatisme et une meilleure gestion des contraintes mécaniques. Les aberrations hors-axe sont réduites et la frontale est importante (voir Chapitre 5).

6. Détection

L'architecture d'un endomicroscope multiphotonique est compatible avec les différentes modalités de détection présentes en microscopie de table. Comme nous l'avons vu précédemment, la détection se situe en amont de la fibre optique et requière l'utilisation de miroirs dichroïques et de filtres afin de séparer la réponse non-linéaire VIS provenant de l'échantillon du faisceau excitateur IR (Figure 35).

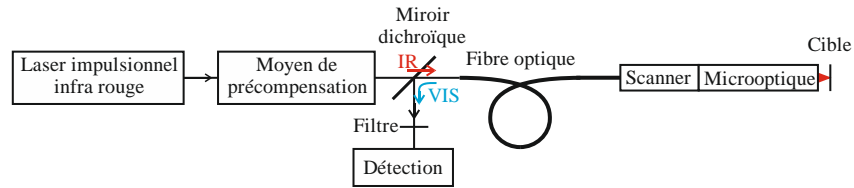


Figure 35 : Architecture d'un endomicroscope multiphotonique. IR : Infrarouge ; VIS : Visible.

Parmi les modalités de détection possibles, on peut citer :

- La détection analogique qui mesure la valeur moyenne du flux photonique collecté. La détection est effectuée à l'aide d'un photomultiplicateur (PM), d'une photodiode à avalanche ou encore d'un détecteur hybride. Nous avons choisi d'utiliser un PM car son efficacité quantique peut être supérieure à 30% dans le visible (voir chapitre 4) et la surface de détection est importante (i.e. 5 mm) ce qui permet une bonne compatibilité avec les fibres à double gaine fortement multimodes. Afin de discriminer les différentes réponses spectrales des constituants de la matière biologique, il est possible d'avoir recours à plusieurs canaux de détection grâce à différents miroirs dichroïques, filtres et détecteurs.
- La détection spectroscopique qui consiste en l'observation dans le domaine spectral de la réponse détectée permettant ainsi une analyse plus complète. La mesure est effectuée grâce à un spectroscopie à la place du PM.
- Le comptage de photons est une mesure effectuée à faible flux permettant de compter chaque photon collecté en éliminant une partie des bruits dû au détecteur (faux coups, bruit d'amplitude des PMs) [Benninger 08]. Il est nécessaire d'avoir recours à un détecteur et à une électronique en aval du détecteur suffisamment rapides capables de discriminer deux photons consécutifs avant de les compter (voir chapitre 3).
- Le comptage de photons résolu en temps (en anglais : Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) : en fluorescence, les spectres d'émission sont souvent superposés. Afin de distinguer deux fluorophores ayant des spectres se recouvrant, il est alors possible avec une mesure FLIM de déterminer le temps moyen de désexcitation propre à chacun. Cette solution requière également une électronique rapide spécifique.
- La spectroscopie de corrélation de fluorescence (en anglais : Fluorescence cor-

relation spectroscopy, FCS). Il s'agit d'une technique s'intéressant aux fluctuations du comptage de photons de fluorescence d'un milieu liquide et permettant entre autre de remonter aux coefficients de diffusion des molécules fluorescentes.

II. Exemples d'endomicroscopes multiphotoniques opérationnels

1. Montages expérimentaux

De par le monde plus d'une dizaine de groupes travaillent activement sur la réalisation d'endomicroscopes multiphotoniques. Au cours des dix dernières années, ces différents travaux ont donné lieu à plus d'une cinquantaine de publications, et de nombreux brevets (US). Des industriels sont aussi présents sur le sujet de l'endomicroscopie, à savoir Mauna Kea Technologies (France), OptiScan (Australie) ou encore Philips (Pays-Bas). Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser uniquement aux deux réalisations les plus abouties ayant permis des acquisitions in vivo in situ. Celles-ci ont été développées par :

- le groupe du professeur Min Gu de l'université de Swinburne en Australie [Bao 08, 10 b, Gu 14 b] en association avec la société OptiScan.

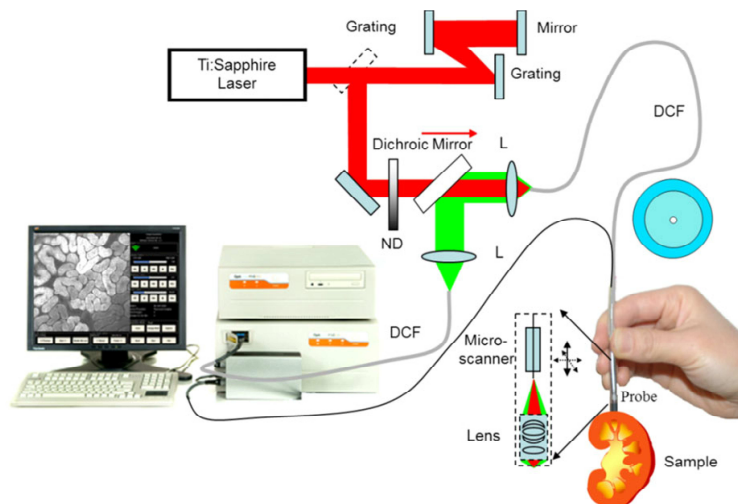


Figure 36 : Schéma d'un endomicroscope biphotonique. [Gu 14 b]

- le groupe du professeur Chris Xu de l'université Cornell dans l'état de New York aux Etats Unis [Brown 12, Ouzounov 13 b].

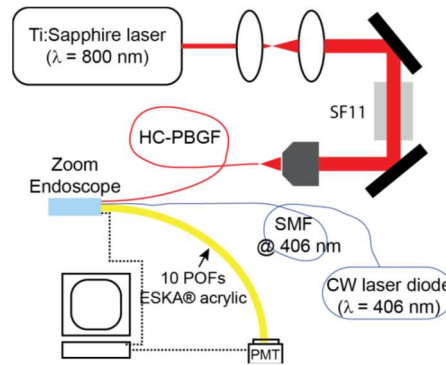


Figure 37 : Schéma d'un endomicroscope biphotonique. [Ouzounov 13 b]

Nous allons dans un premier temps nous intéresser aux différents éléments choisis dans les deux dispositifs précédents.

Note : un troisième groupe de recherche a publié des résultats d'endomicroscopie multiphotonique in vivo. Il s'agit du groupe dirigé par Fritjof Helmchen de l'Université de Zurich [Engelbrecht 08]. Les travaux qu'il a publiés sur ce sujet ont été obtenus en collaboration avec Eric J. Seibel de l'Université de Washington à Seattle aux USA qui est spécialiste de la mise au point de micro-scanners à fibre optique. Bien qu'aboutissant à une observation in vivo sur des rats anesthésiés, ce travail n'a pas été retenu dans l'analyse comparative que j'ai menée ci-dessous pour la raison qu'il s'écarte fortement du cahier des charges que je me suis fixé au chapitre 1. En effet les images ont été obtenues in vivo avec 200 mW sur les tissus ce qui est colossal. De plus elles ont été réalisées grâce à un marquage exogène. Enfin la sonde en question comprend un système micro-optique dédié incluant plusieurs lentilles grins et un prisme dichroïque, l'ensemble ne constituant pas un composant commercial facilement accessible.

	Min Gu (Swinburne)	Chris Xu (Cornell)
Laser	Ti:saphir 80 Mhz, 100 fs, 800 nm	Ti:saphir (MaiTai, Newport) 80 Mhz, 100 fs, 800 nm
Fibre	2,9 m de fibre DC dopé (Fiber-core) Cœur central : 3,6 μm gaine collectrice : 105 μm	1 m de fibre à cœur creux (HC-PBGF, HC-800-2, NKT Photonics). Cœur : 7,5 μm
Moyen de précompensation	Etireur à réseaux	Bloc de verre SF11
Scanner à fibre optique	Actuateur électromagnétique développé par OptiScan (résonnant / non résonnant)	Actuateur formé de deux céramiques piézoélectriques (résonnant / non résonnant)
Optique distale	Lentille sur mesure	Lentille catadioptrique sur mesure (permettant un grandissement par modalité)
Collection	Gaine collectrice de la fibre d'excitation	Couronne de fibres plastiques
Diamètre de la sonde	3 mm	5 mm
Détection	analogique 2PEF et SHG en alterné (1 seul détecteur : changement de filtre)	analogique 2PEF ou réflectance en alterné (un seul détecteur)
Particularités	-	Imagerie de réflectance grand champ (FOV : 1,15 mm)

Tableau 1 : liste des composants utilisés dans les deux endomicroscopes ayant permis des observations in vivo in situ.

2. Performances

Nous avons choisi de nous intéresser à ces deux dispositifs car ils ont permis la réalisation d'acquisition in vivo in situ, ceci sur des reins de rat dans les deux cas. Le Tableau 2 présente les résultats obtenus.

	Min Gu (Swinburne)	Chris Xu (Cornell)
Cible	Rein rat	Rein rat
In vivo	Oui	Oui
SHG in vivo	Non	Non
Marquage	Oui : fluorescéine	Non
Cadence d'image	2 images/s	4,1 images/s mais moyenne sur 3 images dans les images publiées
Champ de vue	475 x 475 μm	160 x 160 μm
Résolution	1 μm	0,8 μm
Durée d'impulsion excita- trice	1,5 ps	110 fs
Puissance sur les tissus	30 mW	60 mW
Profondeur de pénétration	60 μm	140 μm

Tableau 2 : Résumé des résultats obtenus par les endomicroscopes sélectionnés

En ce qui concerne l'équipe de Swinburne, il est remarquable de voir qu'ils ont utilisé une fibre longue (2,9 m) ayant un cœur de petit diamètre (3,6 μm) combinée à un étireur à réseaux. Toutefois, la gestion non optimale des effets linéaires et non-linéaires a abouti à des durées d'impulsions IR excitatrices très importantes (1,5 ps). Dans ces conditions, afin de diminuer la puissance moyenne nécessaire à la production de la réponse non-linéaire, ils ont eu recours à un marquage par un fluorophore exogène très brillant (la fluorescéine). Concernant la SHG qui est accessible grâce à un changement de filtre devant l'unique détecteur du dispositif, certains résultats sont obtenus ex vivo grâce des cibles coopérantes présentant une forte réponse en SHG (tendons de queue de rat). Mais aucun résultat de SHG n'est présenté dans le cas d'observations in vivo in situ. Du point de vue résolution, leur choix s'est porté sur une optique sur mesure privilégiant la dimension maximale du champ de vue tout en conservant une résolution micronique (Figure 38).

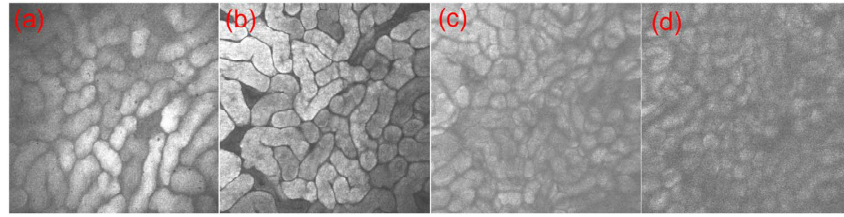


Fig. 4. (Color online) (a) Two-photon fluorescence images of a rat kidney surface. (b)–(d) Rat kidney 20, 40, and 60 μm deep from the surface. The image size is $475\ \mu\text{m} \times 475\ \mu\text{m}$.

Figure 38 : Image in vivo de rein de rat marqué avec de la fluorescéine en 2PEF. [Bao 08]

L'équipe de Cornell a choisi d'exploiter une fibre à cœur creux (à dispersion anormale) de petite longueur (1 m), associée à un simple bloc de verre (à dispersion normale) comme étireur, permettant ainsi de préserver la durée d'impulsion initiale (110 fs). Cependant, ils ont besoin d'une puissance moyenne sur les tissus importante (60 mW) risquant ainsi la présence de photo-dommages. De plus, les images obtenues in vivo in situ sont issues d'un moyennage sur trois images. On peut attribuer cela en partie, à une collection de la réponse non optimale qui s'effectue loin de l'axe optique par une couronne de fibres plastiques placées hors-axe. Du point de vue résolution, utilisant une fibre à cœur de dimension importante ($7,5\ \mu\text{m}$), ils ont choisi une micro-optique ayant un faible grossissement ($\ll 1$) assurant une résolution submicronique, mais qui a eu pour conséquence de réduire le champ de vue ($\text{FOV} = 160\ \mu\text{m}$). Cette limitation a été compensée par l'ajout d'une deuxième modalité (réflectance à 400 nm) grâce à une optique catadioptrique dichroïque à focale double (à 400 nm + à 800 nm). Le diamètre du champ de vue en réflectance est égal à 1 mm ce qui compense le champ de vue réduit donné par l'imagerie multiphotonique ($\text{FOV} = 160\ \mu\text{m}$). Cependant, les deux modalités d'imagerie n'étant pas confocales, les 2 types d'images qu'elles délivrent ne sont pas nettes en même temps (Figure 39 a). Enfin l'imagerie SHG est rendue impossible par la présence du canal en réflectance qui utilise une source à 405 nm.

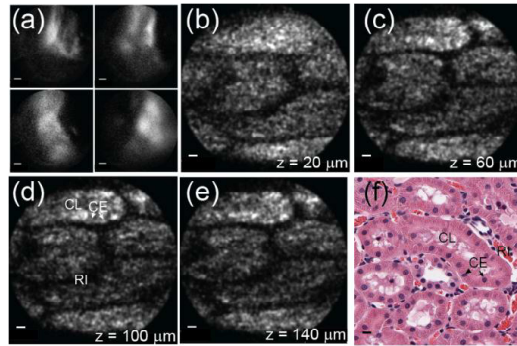


Fig. 5. **In vivo Images of unstained rat kidney tissues.** (A), Low magnification reflection/scattering images of unstained in vivo rat kidney. The fibrous structure of the kidney capsule and outermost features of the kidney cortex are visible. (B)-(E), High-magnification two-photon intrinsic fluorescence image of unstained in vivo rat kidney 20 μm below the surface (B), at $\sim 60 \mu\text{m}$ below the surface (C), at $\sim 100 \mu\text{m}$ below the surface (D) and at $\sim 140 \mu\text{m}$ below the surface (E). (F) High magnification H&E image shows similar features and information as two-photon intrinsic fluorescence images. (B)-(F) show cross sections of proximal convoluted tubules, each tubule contains a central lumen (CL) lined with cuboidal epithelium (CE) and separated by the poorly fluorescent renal interstitium (RI) containing sparse connective tissue components. Scale bars in (A), 100 μm . Scale bars in (B)-(F), 10 μm .

Figure 39 : Image in vivo de rein de rat non marqué en 2PEF. [Ouzounov 13]

Conclusion : les deux dispositifs précédents possèdent certaines caractéristiques se rapprochant d'items présents dans le cahier des charges que nous nous sommes imposés au chapitre 1. Ils présentent cependant de nombreuses limitations (profondeur de pénétration réduite, nombre d'images par seconde faible) et de nombreuses sources d'optimisations (diminution du diamètre, réduction de la puissance déposée sur les tissus, bi-modalité (2PEF+SHG) temps réel, capacité à former une image SHG in vivo). Nous allons tenter de combiner les caractéristiques les plus intéressantes de l'une et de l'autre et d'apporter en supplément des améliorations grâce à des choix innovants et originaux comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

Résumé du Chapitre 2

Ce chapitre débute par la présentation des différents éléments nécessaires à la fabrication d'un endomicroscope multiphotonique, en partant de la source laser, en passant par la fibre optique, par les moyens de précompensation des distorsions linéaires et non-linéaires introduites par la fibre optique, par le dispositif d'imagerie par balayage, et enfin en concluant par la micro-optique d'imagerie distale. Une attention particulière est portée sur les fibres optiques à double gaine qui constituent une solution compacte et efficace pour la collection des signaux issus de la matière biologique. Les différentes modalités possibles pour détecter les signaux utiles sont rapidement listées.

L'état de l'art des réalisations répondant au moins partiellement au cahier de charge qui a été défini au chapitre précédent est ensuite donné. On constate alors que seuls deux groupes de recherche sont parvenus à mettre au point un endomicroscope multiphotonique miniature performant capable de réaliser des images *in vivo in situ* sur animal vivant anesthésié. Les choix technologiques et les performances atteintes dans ces deux cas sont présentés en détail ce qui permet de clairement identifier les limitations qui subsistent et les sources d'optimisation possibles.

Chapitre 3 : Choix d'une architecture avancée pour la réalisation d'un endomicroscope multiphotonique

Nous allons dans ce chapitre présenter les différents éléments innovants utilisés pour la réalisation de l'endomicroscope multiphotonique qui est l'objet de ce travail de recherche.

I. Fibre à double gaine sur mesure pour la biophotonique

La fibre optique est un des points importants pour la réalisation d'un endomicroscope. Comme on l'a déjà vu au chapitre précédent, celle-ci conditionne l'acheminement de l'excitation impulsionnelle infrarouge mais aussi la collection de la réponse non-linéaire visible. Nous avons choisi le type de fibre qui a été défini au Chapitre 2 : I. 2. b. ii. (voir Figure 19) : il s'agit d'une fibre à cœur plein à double gaine à microstructure air-silice (voir Figure 43). Grace à la collaboration avec Alexandre Kudlinski qui est maître de conférences au laboratoire de Physique des Lasers Atomes et Molécules (PhLAM) de l'institut IRCICA de l'Université de Lille 1 nous avons bénéficié d'une fibre optique sur mesure dédiée à l'endomicroscopie multiphotonique haute résolution. Entre autres propriétés, cette fibre est exempte de dopage et donc de risque d'autofluorescence. Elle a été conçue afin de pouvoir combiner tout un ensemble d'autres qualités essentielles qui seront décrites en détail ultérieurement.

1. Fabrication de la fibre optique

La mise au point de cette fibre optique a demandé des travaux de simulation numériques suivis de la fabrication de plusieurs prototypes. Ces derniers ont nécessité chacun différentes étapes d'assemblage et de très nombreux tirages au niveau de la tour de fibrage optiques de l'IRCICA parmi lesquelles on peut citer de façon non exhaustive :

- 1^{er} élément : réalisation de la couronne d'air de la deuxième gaine (voir Figure 40 et suivantes) : assemblage de tubes de silice creux passant par 4 tirages.
- 2^{ème} élément : fabrication du cœur central et de sa microstructure : assemblage de la microstructure nécessitant 5 tirages.

- 3^{ème} élément : réalisation d'un tube de silice creux ayant les dimensions permettant l'adaptation du diamètre externe du cœur central microstructuré (2^{ème} élément) au diamètre interne de la couronne d'air (1^{er} élément).
- assemblage des trois éléments précédents suivi d'1 tirage.
- tirage final de la fibre optique : gestion de trois pressions d'air différentes à trois endroits différents afin d'ajuster la taille des trous dans la microstructure interne et au niveau de la couronne d'air de la deuxième gaine, et aussi afin de fusionner les trois éléments précédents.

La dernière étape est la plus critique puisqu'elle conditionne le résultat final. Elle définit les dimensions du cœur excitateur ainsi que l'ouverture numérique de la gaine collectrice. Dans une ultime phase qui a lieu en dernier pendant le dernier fibrage la fibre est revêtue d'une gaine mécanique polymère qui lui permet d'être plus résistante en torsion. Cette gaine peut être très facilement enlevée lorsque les propriétés mécaniques de la silice seule sont recherchées ce qui sera le cas au chapitre 5.

Par la suite, nous n'évoquerons que de façon anecdotique les divers prototypes qui ont fait partie de la phase de mise au point de la fibre. Nous nous focaliserons sur la fibre finale dont la référence est pour mémoire T1628C et qui est celle ayant servi à l'acquisition des résultats présents dans la suite de ce manuscrit.

2. Caractéristiques fondamentales de la fibre T1628C

a. Cœur central

La fibre T1628C possède un cœur central parfaitement monomode @ 800 nm d'environ 3,55 μm , qui est entouré d'une microstructure de 34 μm de diamètre (voir Figure 40). Cette dernière est constituée de 106 trous d'air d'un diamètre de 1,5 μm et de deux trous plus importants de 2,5 μm servant au maintien de la polarisation. La propagation dans ce cœur central présente une atténuation de quelques dizaines de dB par kilomètre, un coefficient de dispersion d'ordre 2 d'environ 64 fs/(nm.m) et une ouverture numérique de 0,13 calculés à 810 nm. En prenant un certain nombre de précautions comme l'adaptation de l'optique d'injection à celle du cœur monomode central de la fibre, il a été possible d'injecter jusqu'à 60% de la lumière incidente spécifiquement dans ce cœur central.

En outre nous avons opté pour un cœur à maintien de polarisation ce qui est avantageux pour le déport d'impulsion mais aussi en vue de l'imagerie SHG du collagène, ce sur quoi nous reviendrons ultérieurement. Cette propriété de maintien de polarisation est obtenue en rendant le cœur fortement biréfringent. Pour cela, la structure présente deux trous d'air de diamètre important de part et d'autre du cœur (Figure 40). Cette géométrie est dite « panda ».

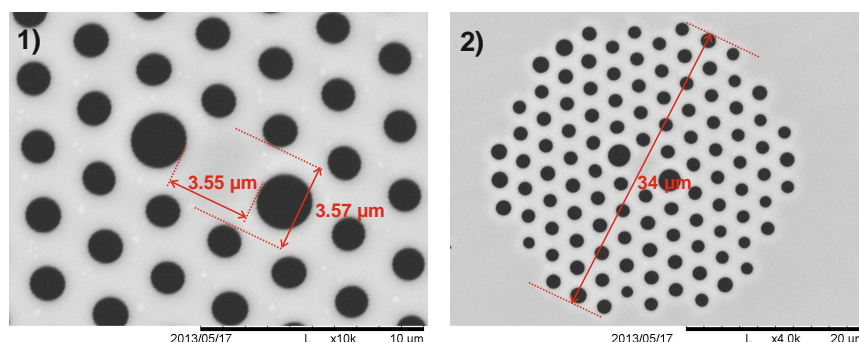


Figure 40 : Image en microscopie électronique à balayage du cœur de la fibre T1628C ; 1) : cœur à maintien de polarisation ; 2) : microstructure entourant le cœur central.

La biréfringence de groupe Δn_g du cœur monomode de la fibre T1628C a été mesurée dans un premier temps par Alexandre Kudlinski qui a fabriqué cette fibre. La technique employée utilise le principe de l'interférométrie spectrale large bande [Cao 94]. Dans cette technique des interférences spectrales entre les deux modes propres à polarisation à longueur de fibre donnée produisent un interférogramme spectral constitué de cannelures périodiques de période $\Delta\lambda$:

$$\Delta\lambda = \frac{\lambda_0^2}{\Delta n_g L} \quad (2.1)$$

L étant la longueur de la fibre et λ_0 la longueur d'onde centrale du spectre large utilisé. Cette mesure menée au PhLAM à 800 nm a donné $\Delta n_g = 1,45 \cdot 10^{-4}$. L'ordre de grandeur de ce résultat est caractéristique d'une fibre à maintien de polarisation (http://www.rp-photonics.com/polarization_maintaining_fibers.html). Le taux d'extinction entre les deux modes propres à polarisation a également été mesuré et est proche de 20 dB ce qui prouve que ce cœur est à maintien de polarisation comme souhaité.

En guise de confirmation, nous avons également mesuré à XLIM la biréfringence de groupe de la même fibre par deux techniques : par la technique d'interférométrie spectrale utilisée par le PhLAM et par une technique temporelle directe cette fois-ci. Dans ce cas, on envoie

une impulsion unique à l'entrée de la fibre de façon à exciter les deux modes propres à polarisation de façon équilibrée. A la sortie de la fibre l'écart de temps de groupe qui sépare les deux impulsions polarisées orthogonalement qui sont associées à chacun des modes propres est mesuré à l'aide d'un autocorrélateur (Figure 41). Lors de cette mesure le système de précompensation de la dispersion chromatique que nous verrons un peu plus loin dans ce chapitre, ne permet pas de comprimer idéalement en bout de fibre simultanément les deux impulsions précédentes car les dispersions de vitesse de groupe des deux modes propres sont différentes. L'éti-
 reur est alors réglé pour comprimer partiellement de façon équilibrée les deux impulsions :

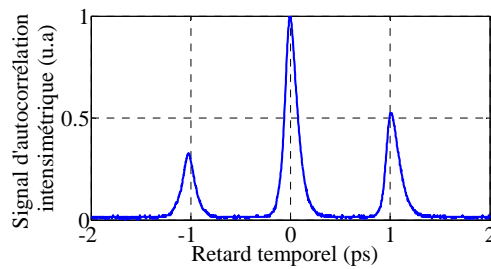


Figure 41 : Trace d'autocorrélation obtenue à la sortie de la fibre T1628C de longueur $L = 2,07$ m lorsque les deux modes propres à polarisation sont excités à l'entrée de façon équilibrée par une unique impulsion de polarisation adaptée. Le retard de groupe entre les deux modes mesuré sur cette figure vaut $\Delta t_g = 1,02$ ps.

L'écart d'indice de groupe des deux modes propres à polarisation qui se déduit de cette mesure vaut alors :

$$\Delta n_g = \frac{c \Delta t_g}{L} = 1,48 \cdot 10^{-4} \quad (2.2)$$

c étant la vitesse de la lumière dans le vide. Dans le cas de la mesure effectuée à XLIM (Figure 42) avec la méthode du spectre cannelé, on obtient un écart d'indice de groupe $\Delta n_g = 1,45 \cdot 10^{-4}$ à $\lambda_0 = 810$ nm, de telle sorte que toutes les mesures de biréfringence de groupe sont tout à fait cohérentes entre elles.

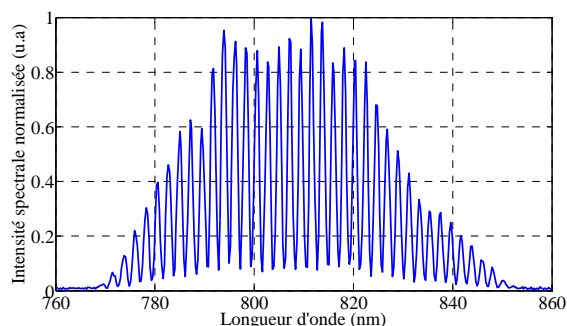


Figure 42: Interférogramme spectral mesuré à XLIM issu de l'interférence spectrale entre les deux modes propres à polarisation, conformément à la méthode décrite par [Cao 94]. La période des franges spectrales mesurée vaut $\Delta\lambda = 2,18$ nm pour une longueur de fibre égale à 2,07 m.

b. Caractéristiques de la deuxième gaine collectrice

La fibre optique possède une gaine collectrice importante (diamètre = 188 μm) entourée d'une couronne d'air maintenue à l'aide d'un manchon de silice de 260 μm de diamètre extérieur (Figure 43).

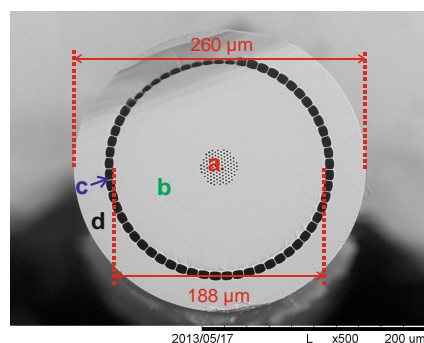


Figure 43 : Image en microscopie électronique à balayage de la fibre T1628C à double gaine microstructurée air-silice. (a) : cœur central entouré de sa microstructure ; (b) : deuxième cœur = première gaine collectrice ; (c) : couronne d'air ; (d) : manchon de maintien.

Lors de la fabrication de la fibre, la pression appliquée au niveau de la couronne d'air permet de modifier la taille des trous d'air et de ce fait, la taille des ponts de silice présents entre les trous. La diminution de la taille des ponts permet d'augmenter l'ouverture numérique mais en contrepartie la fibre devient plus fragile. Il est toutefois possible de compenser cette fragilité en augmentant la dimension du manchon, mais cela s'effectue au détriment de la compacité et de la flexibilité de la fibre. Comme nous le verrons plus tard, l'ouverture numérique (ON) de la gaine collectrice (dans une certaine limite) n'intervient pas dans le rendement de collection puisque c'est la micro-optique qui la limite dans le cas de l'endomicroscope développé. Nous

avons donc préféré exploiter une ouverture numérique de fibre modérée. Cette ON a été mesurée avec la méthode présentée dans [Wadsworth 04]. La mesure a donné une $ON = 0,27$ à 405 nm .

La fibre présente une importante flexibilité lorsqu'elle est revêtue de sa gaine polymère (rayon de courbure minimum d'environ $4,5\text{ mm}$) (Figure 44).



Figure 44 : Flexibilité de la fibre du PhLAM.

3. Fibres commerciales concurrentes

Afin de tester l'efficacité de notre fibre optique, nous avons réalisé un test comparatif avec deux fibres à double gaine commerciales. La première fibre est une fibre dopée vendue par la société Liekki (DC 6/125 PM). La deuxième est une fibre microstructurée air-silice à cœur plein produite par la société NKT Photonics (DC 165-16-P).

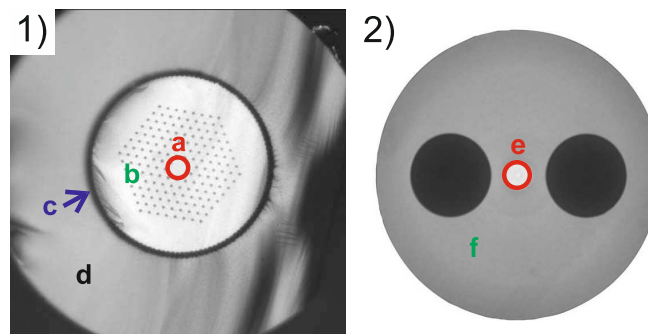


Figure 45 : Fibres DC commerciales : 1) fibre NKT Photonics DC 165-16-Passive ; (a) : cœur central monomode ; (b) : gaine collectrice microstructurée multimode ; (c) : couronne d'air ; (d) : manchon ; 2) Liekki (DC 6/125 PM) ; (e) : cœur central monomode ; (f) : gaine collectrice multimode.

Le tableau ci-dessous répertorie différentes caractéristiques des fibres optiques comparées. On peut voir que la fibre T1628C possède la plus grande surface de collection. En ce qui concerne l'excitation, nous avons décidé d'exploiter un petit cœur afin d'améliorer la résolution du dispositif d'imagerie. Cependant il est à prévoir que les effets non linéaires seront plus importants dans la fibre T1628C. Nous verrons que ceux-ci ne sont pas réellement pénalisants grâce à l'utilisation d'une précompensation efficace.

Caractéristiques :	PhLAM (T1628C)	Liekki (DC 6/125 PM)	NKT Photonics (DC 165-16-P)
Dopée	Non	Oui	Non
Cœur central	Diamètre : 3,5 μm	Diamètre : 5,5 μm	Diamètre : 16 μm
Maintien de polarisation	Oui	Oui	Non
Gaine collectrice	Diamètre : 188 μm ON = 0,27 à 405 nm	Diamètre : 125 μm ON = 0,43 à 405 nm	Diamètre : 163 μm ON = 0,58 à 405 nm
Surface effective de collection	28 000 μm^2	12 000 μm^2	21 000 μm^2
Diamètre total hors gaine mécanique polymère	260 μm	125 μm	350 μm

Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques des fibres optiques comparées.

Nous allons maintenant voir les différents tests ayant servi à vérifier les performances de la fibre développée.

4. Tests comparatifs

a. Résolution

Un des points importants de la fibre à double gaine microstructurée air-silice à cœur plein développé est la présence d'un cœur de dimension réduite (3,5 μm). Comme cela a été évoqué précédemment, les fibres utilisées dans le domaine de l'endomicroscopie multiphotonique possèdent généralement des cœurs de diamètre important afin de limiter la présence d'effets non linéaires. En contrepartie le système optique associé doit présenter un grandissement très faible ($\ll 1$) ce qui pénalise alors la miniaturisation.

Nous avons réalisé des tests de résolution optique en fluorescence à deux photons pour chacune des trois fibres en les associant au même système optique. Celui-ci est l'association de trois lentilles doublets achromatiques. Il permet d'obtenir un grandissement γ de -0,48, tout en ayant des ouvertures numériques compatibles avec les trois fibres, à savoir 0,19 (côté fibre optique) et 0,45 (côté échantillon) ainsi qu'une distance de travail importante d'environ 475 μm . De plus, chaque lentille est traitée afin de limiter les pertes par réflexion de 400 à 700 nm. Plus de détails seront apportés sur ce microsystème optique au chapitre 5.

Les mesures consistent à réaliser l'image de billes fluorescentes de dimension connue (billes de $0,5\ \mu\text{m}$ de diamètre). Les images ont été réalisées à l'aide du système de balayage miniaturisé (scanner à fibre) qui sera présenté lors du chapitre 5. Les billes étant plus petites que la résolution de l'instrument, le profil en intensité de celle-ci (Figure 46) correspond au profil du foyer. Il est alors possible de déconvoluer la dimension des billes afin d'obtenir la fonction d'étalement du foyer (en anglais : Point Spread Function, PSF), correspondant à la résolution latérale du système.

Au cours de ces mesures nous avons obtenu une PSF de $3.22\ \mu\text{m}$ pour la fibre NKT Photonics (DC 165-16-Passive), de $1,2\ \mu\text{m}$ pour la fibre Liekki (DC 6/125 PM) et enfin de $0,83\ \mu\text{m}$ pour la fibre du PhLAM (T1628C). Comme nous l'attendions, nous obtenons bien un gain significatif du point de vue de la résolution grâce à la réduction de la taille du cœur de la fibre.

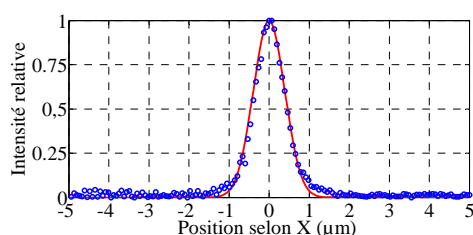


Figure 46 : Mesure de la résolution latérale en 2PEF pour la fibre T1628C

La résolution axiale Δz est un point clé dans le cas de la microscopie multiphotonique. Celle-ci conditionne la qualité des images obtenues à partir de tissus épais, ainsi que la capacité à effectuer des acquisitions en trois dimensions. En effet dans le cas d'une résolution axiale plus grande que l'objet observé, l'image obtenue correspond à la superposition des contributions venant des différentes épaisseurs, donnant alors une image floue. Au contraire dans le cas d'une résolution axiale plus petite, il devient alors possible de faire du sectionnement optique puis, en variant z , de visualiser la cible en trois dimensions.

Il est possible en utilisant des formules présentées dans la thèse de Delphine Débarre [Debarre 06] d'estimer la résolution axiale à partir de la résolution latérale. Nous obtenons alors après calcul une résolution axiale théorique de $86\ \mu\text{m}$ pour la fibre NKT Photonics (DC 165-16-Passive), de $11,8\ \mu\text{m}$ pour la fibre Liekki (DC 6/125 PM) et enfin de $5,5\ \mu\text{m}$ pour la fibre du PhLAM (T1628C). La résolution axiale obtenue avec la fibre NKT Photonics est très proche de la profondeur de pénétration maximale atteinte par les deux dispositifs présentés à la fin du

chapitre 2 (60 μm pour [Bao 08] et 140 μm pour [Ouzounov 13]). Il est alors difficilement envisageable d'utiliser cette configuration pour obtenir des images nettes et résolues en profondeur. Cette fibre ne permet donc pas de tirer pleinement parti du sectionnement optique et de la profondeur de pénétration accrue qui sont pourtant des avantages fondamentaux des imageries multiphotoniques. Par contre la fibre du PhLAM, qui possède une très bonne résolution axiale, est optimale à ce point de vue.

b. Efficacité de collection

Comme on l'a vu précédemment, l'efficacité de collection de la fibre optique est un critère important dans le cadre de la réalisation d'un dispositif d'endomicroscopie multiphotonique. Pour un même signal mesuré, si l'on améliore la collection de la fibre, il est possible de réduire la puissance d'excitation et de réduire par conséquent les risques de photodommage.

Afin de comparer les efficacités de collection de chacune des trois fibres à double gaine, nous avons développé le banc de mesure suivant (Figure 47) :

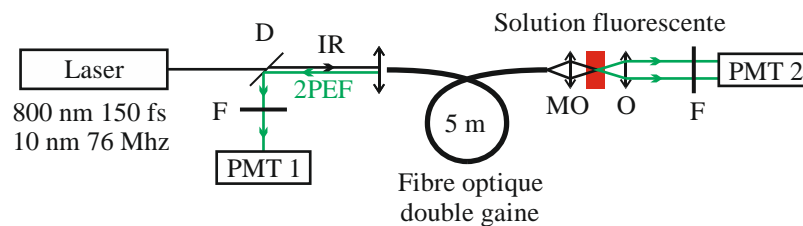


Figure 47 : Banc de mesure de l'efficacité de collection des fibres ; F : filtre (FF01-720/SP-25, Semrock) ; D1 : miroir dichroïque (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; MO : Micro-optique (voir Chapitre 5) ; O : objectif de microscope (UPLSAPO-60X, Olympus). Le module de pré-compensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre sur lequel nous reviendrons ultérieurement n'est pas représenté sur cette figure.

Nous injectons dans le cœur central de la fibre à caractériser le faisceau du laser femtoseconde. Puis à l'aide des mêmes micro-optiques que précédemment, nous focalisons le faisceau dans une solution fluorescente. Il y a alors production d'un signal de 2PEF. Nous réalisons pour différentes puissances d'excitation, la mesure du signal à l'aide de deux photomultiplicateurs (H7422P, Hamamatsu), le premier étant placé avant la fibre optique en position proximale (PMT1), correspondant au signal collecté, et un autre en bout de fibre en position distale (PMT2), qui donne une mesure proportionnelle au signal de fluorescence non linéaire généré.

La Figure 48 représente l'évolution du signal collecté en fonction du signal généré pour les trois fibres ce qui donne une idée de l'efficacité de collection dans chacun des cas. La fibre NKT et la fibre du PhLAM donnent la même efficacité de collection alors que la fibre NKT a pourtant une ON de deuxième gaine bien supérieure (0,58 pour 0,27). On peut en déduire que dans cette situation (cible non diffusante) l'efficacité de collection du système est conditionné par la micro-optique. La fibre Liekki est moins efficace possiblement à cause d'un problème d'autofluorescence due à la présence de dopants.

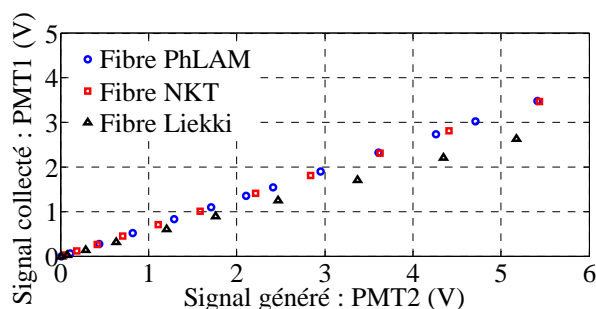


Figure 48 : Mesure de l'efficacité de collection des trois fibres, fibre du PhLAM (T1624C), fibre NKT Photonics (DC 165-16-Passive) et la fibre Liekki (DC 6/125 PM).

Cependant, dans le cas d'une observation de tissus biologiques, nous serons en présence de diffusion de la réponse pouvant modifier l'efficacité de collection à cause d'un effet de surface. Nous réalisons alors la même étude dans le cas d'un fantôme diffusant (Figure 49). Il s'agit de gel échographique auquel ont été ajoutés de la fluorescéine et du lait. La diffusion résultante a été mesurée préalablement. La concentration en lait est telle que le libre parcours moyen mesuré est égal à 100 microns.

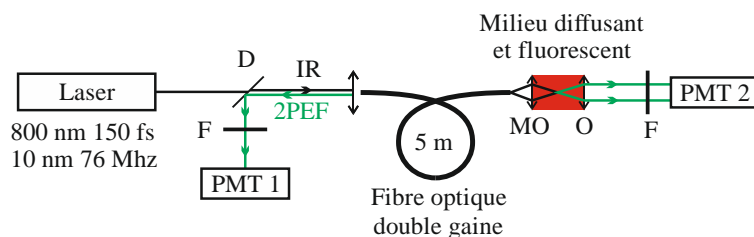


Figure 49 : Banc de mesure de l'efficacité de collection de la fibre optique dans le cas d'un milieu diffusant ; F : filtre (FF01-720/SP-25, Semrock) ; D1 : miroir dichroïque (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; MO : Micro-optique (voir Chapitre 5) ; O : objectif de microscope (UPLSAPO-60X, Olympus). Le module de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre sur lequel nous reviendrons ultérieurement n'est pas représenté sur cette figure.

L'analyse des données de la Figure 50 montre que la fibre du PhLAM collecte respectivement 1,2 et 1,34 fois mieux la réponse que la fibre NKT Photonics et la fibre Liekki. Ces

gains évoluent qualitativement de la même manière que les valeurs des rapports de surface de gaine collectrice des fibres qui valent respectivement 1,3 et 2,3 (PhLAM vs NKT et PhLAM vs Liekki).

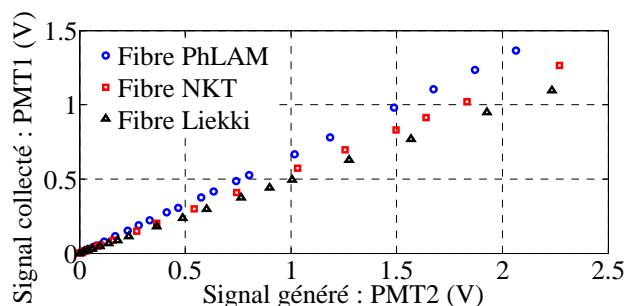


Figure 50 : Mesure de l'efficacité de collection des trois fibres, fibre du PhLAM (T1624C), fibre NKT Photonics (DC 165-16-Passive) et la fibre Liekki (DC 6/125 PM).

Maintenant que nous avons évalué l'efficacité de notre fibre d'un point de vue résolution et collection de la réponse non-linéaire, nous allons nous intéresser à la précompensation des effets linéaires et non-linéaires subis par les impulsions lors de la traversée de la fibre.

II. Précompensation des effets linéaires et non-linéaires

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'acheminement d'impulsions femtosecondes au travers d'une fibre optique nécessite l'utilisation d'un dispositif de précompensation des effets linéaires et non-linéaires ayant lieu dans la fibre optique. Actuellement dans le domaine de l'endomicroscopie multiphotonique, la gestion de la précompensation n'est pas optimale. Nous avons donc choisi une architecture avancée.

La stratégie de précompensation qui va être présentée ici est le fruit de travaux antérieurs ayant eu lieu durant trois thèses s'étant déroulées à XLIM entre 2003 et 2012 [Kalashyan 12, Lefort 12, Lelek 06].

1. Présentation du dispositif de précompensation

a. Gestion des effets non-linéaires

On a vu dans le chapitre précédent que lors de l'utilisation d'un étireur à dispersion anormale (négative) en amont de la fibre, l'automodulation de phase de type Kerr se produisant dans la fibre à non-linéarité (positive), il apparaît un effet de compression spectrale dans les

derniers centimètres de la fibre. Cet effet a pour conséquence l'augmentation de la durée des impulsions comprimées à la sortie du compresseur qu'est la fibre. La solution la plus souvent utilisée pour éviter cela consiste à travailler avec une fibre optique à gros cœur comme la fibre DC 165-16-Passive de chez NKT. Cependant nous n'avons pas privilégié cette solution puisque nous savons qu'en contrepartie avec cette fibre la résolution serait très fortement détériorée.

La solution que nous avons retenue consiste non pas à réduire les effets non-linéaires mais à les pré-compenser. Il a été montré précédemment [Clark 01, Lefort 12, Lelek 06] qu'il était pertinent pour cela d'élargir préalablement le spectre en amont de la fibre endoscopique. Une première solution consiste à avoir recours à un laser ultra-large bande [Kalashyan 12 b]. Mais comme cela a été indiqué lors du chapitre 2, ce type de laser représente généralement un coût important et est, notamment pour cette raison, très peu répandu dans les laboratoires de biophysique et de biologie.

Une autre solution [Clark 01, Lefort 12, Lelek 06] consiste à partir d'un laser Ti:saphir classique, à bande relativement étroite délivrant des impulsions d'environ 150 fs avec un peu moins de 10 nm de bande, puis à élargir le spectre à l'aide d'un milieu non linéaire. Pour cela nous pouvons utiliser une première fibre optique monomode standard (Figure 51) [Lefort 12, Lelek 06]. En effet, comme on l'a évoqué au chapitre 2, en l'absence de modulation de phase préalable (i.e. en sortie de l'oscillateur laser), l'automodulation de phase de type Kerr se produisant dans cette première fibre permet d'élargir le spectre des impulsions.

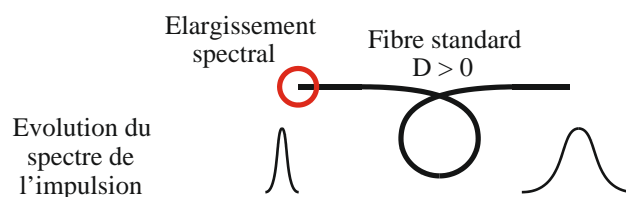


Figure 51 : Elargissement spectral à l'aide d'une fibre optique monomode standard.

Ainsi nous avons ajouté dans le système 50 cm de fibre monomode standard à maintien de polarisation (cœur monomode de 4,2 μm de diamètre) à la sortie du laser et injecté plus de 420 mW de puissance moyenne dans cette fibre. Pour contrôle, nous avons réalisé la mesure du spectre des impulsions avant et après cette fibre (Figure 52).

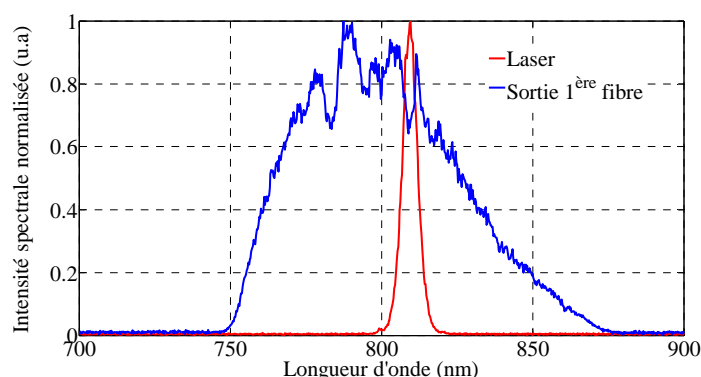


Figure 52 : Mesure du spectre des impulsions (spectroscopie commerciale AvaSpec-2048 de chez Avantes), à la sortie du laser et à la sortie de la première fibre de 50 cm avec 420 mW dans cette dernière.

Nous obtenons bien comme souhaité un élargissement du spectre de l'impulsion qui passe d'une largeur à mi-hauteur (FWHM) de 6 nm à 64 nm.

En contrepartie, l'utilisation d'un spectre ultra-large entraîne une plus grande sensibilité aux effets de la dispersion chromatique (ordres de dispersion supérieurs à 2 inclus) qu'il nous faut maintenant absolument corriger finement.

b. Gestion des effets linéaires jusqu'à l'ordre 3 inclus

Il existe deux principaux effets linéaires à maîtriser : la biréfringence et la dispersion chromatique. Pour la biréfringence, la fibre endoscopique T1628C est à maintien de polarisation permettant ainsi de confiner les impulsions selon un mode propre à polarisation. Le dédoublement de l'impulsion par biréfringence de groupe est alors contrôlé.

En ce qui concerne la dispersion chromatique, les étireurs présentés au chapitre 2 permettent la précompensation de la dispersion uniquement à l'ordre 2. Or Mickaël Lelek a mis en évidence durant sa thèse [Lelek 06] que l'utilisation d'un spectre ultra-large dans ce type d'architecture nécessitait une précompensation de la dispersion jusqu'au 3^{ème} ordre inclus. Nous avons alors opté pour un étireur à grisms [Tournois 93] avec lequel il est possible de précompenser la dispersion d'ordre 2 et 3 simultanément et indépendamment. Un grism est un composant optique qui est l'association d'un réseau de diffraction et d'un prisme (en anglais GRISM = GRating et prISM). Pour cela il est possible de graver un réseau de diffraction sur un prisme [Tournois 69], ou bien tout simplement comme nous l'avons fait, d'accoler un réseau de diffraction à un prisme [Kalashyan 12, Lefort 12, Tavella 07]. L'étireur est alors composé de deux grisms

positionnés de manière antiparallèle de façon similaire à une ligne Treacy (Figure 53).

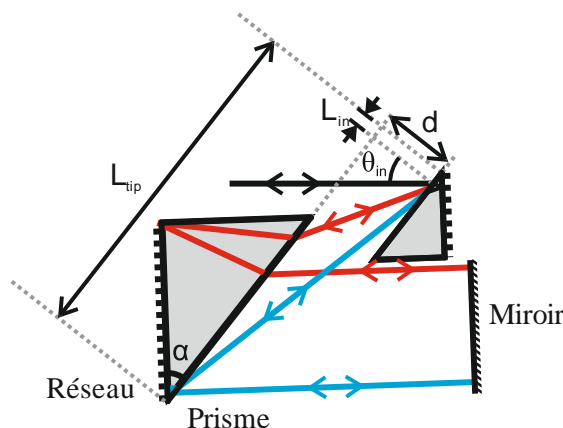


Figure 53 : Etireur à grisms.

Comme dans le cas d'un étireur à réseaux, le faisceau voit ses composantes spectrales se disperser angulairement après le premier grism avant d'être re-collimatées par le second. Ensuite à l'aide d'un miroir, les différentes longueurs d'onde du faisceau parcourent le chemin inverse et ainsi reconstituent le faisceau parallèle de départ. L'éjection du faisceau retour a lieu grâce à un miroir coupé et à l'ajout d'un petit angle entre le faisceau incident et le faisceau réfléchi dans le plan orthogonal au plan de dispersion (plan vertical en l'occurrence). L'ajustement aux ordres 2 et 3 de la phase spectrale donnée par l'étireur à grism est possible en faisant varier l'angle d'incidence θ_{in} sur le premier grism et la distance d entre les grisms. La contribution de la position du faisceau incident par rapport à la pointe du premier grism, notée L_{in} sur le schéma de la Figure 53, a une influence faible sur la dispersion de l'étireur. Le deuxième grism est plus gros que le premier afin de capter tout le faisceau dispersé qui l'éclaire.

Le design de l'étireur a été réalisé au cours des thèses de Meri Kalashyan et de Claire Lefort [Kalashyan 12, Lefort 12]. Il a été réalisé à partir de composants commerciaux (i.e. deux prismes en BK7 de 40° traités antireflet (H-K9L, Union Optics) et deux réseaux de 600 traits/mm blazés à 800 nm au premier ordre (53066BK02-351R, Richardson Gratings)).

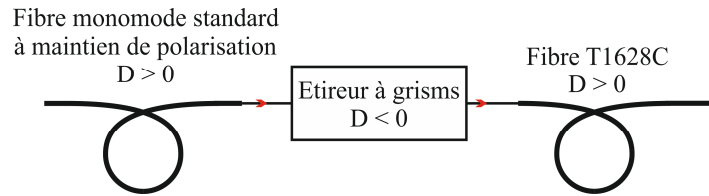


Figure 54 : Schéma bloc du dispositif de déport d'impulsion.

A titre d'exemple avec ces composants et pour une première fibre standard de 0,5 mètres de long et pour une deuxième fibre T1628C de 5 mètres de long, on obtient un système compensé à l'ordre 2 et 3 de dispersion avec le jeu de paramètre de l'étireur suivant : $\theta_{in} = 35,5^\circ$; $d = 19 \text{ mm}$. A noter que le réglage de l'étireur est quasiment indépendant du niveau de puissance dans les fibres.

En outre ce système de déport d'impulsions femtosecondes par fibre optique est accordable en longueur d'onde. Il a été montré que la bande d'accordabilité était approximativement égale à 100 nm [Lefort 14, Peyrot 12], ceci sans changer l'étireur mais en l'accordant après chaque changement de longueur d'onde du laser.

2. Caractérisation des impulsions comprimées en bout de fibre endoscopique

La caractérisation des impulsions est réalisée à l'aide du montage expérimental ci-dessous. Celui-ci est alimenté par un oscillateur femtoseconde Ti:saphir commercial MIRA 900 (Coherent Inc.). Ce laser est réglé afin de délivrer des impulsions d'une centaine de femtosecondes à 80 MHz, d'environ 10 nm de bande centrée sur 810 nm avec une puissance moyenne fixée à 420 mW dans la première fibre. On place à la sortie du laser un isolateur afin d'éviter les réflexions pouvant le perturber. Les différents éléments utilisés étant sensibles à la polarisation (fibre à maintien de polarisation, réseau de diffraction, ultérieurement filtres et dichroïques), nous utilisons des lames demi-onde afin de l'ajuster avant chaque dispositif.

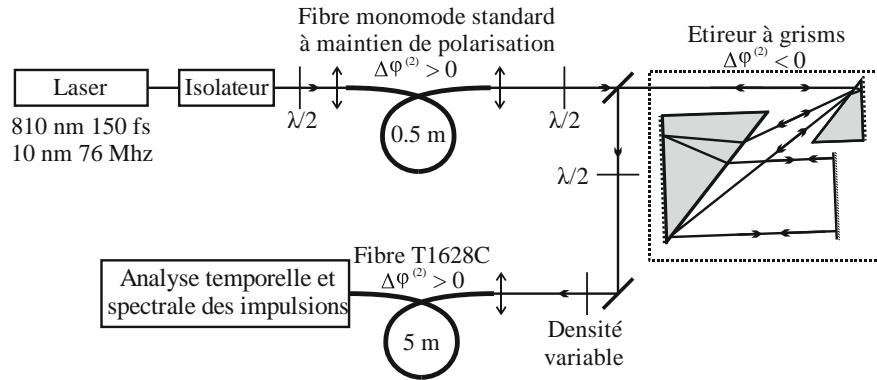


Figure 55 : Montage expérimental pour le déport d'impulsions ultra-courtes et intenses par fibre optique avec en sortie les moyens de caractérisation de ces impulsions.

Les impulsions sont donc élargies spectralement par la 1^{ère} fibre pré-compensatrice puis mises en forme temporellement par l'étireur à grisms. Elles sont ensuite acheminées au travers de 5 mètres de fibre à double gaine microstructurée air-silice à cœur plein (design T1628C). La puissance en sortie du dispositif est ajustée à l'aide d'une densité variable réfléchive positionnée à l'entrée de la fibre T1628C.

Nous réalisons dans un premier temps le réglage de l'étireur afin de compenser efficacement la dispersion ayant lieu dans les deux fibres. Puis nous effectuons des mesures de spectre en différents points du dispositif. La Figure 56 présente les mesures spectrales correspondantes à une puissance de 20 mW à la sortie de la fibre T1628C.

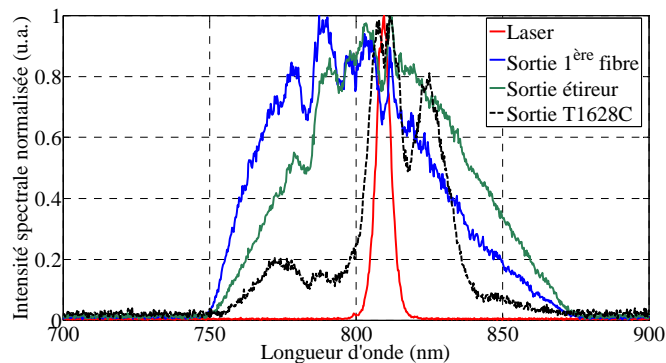


Figure 56 : Mesures spectrales avec le spectroscopie commercial AvaSpec-2048 (Avantes), à la sortie du laser, à la sortie d'une première fibre de 50 cm, à la sortie de l'étireur à grisms et à la sortie de la fibre T1628C.

Le tableau ci-dessous regroupe les puissances moyennes, les efficacités énergétiques ainsi que les largeurs spectrales (FWHM) en les différents points du système.

	Puissance moyenne (mW)	Efficacité éner- gique (%)	Largeur spectrale (nm)
Sortie laser	600	-	6
Sortie 1^{ère} fibre	414	69	64
Sortie étireur	83	20	62
Sortie fibre T1628C	20	24	27

Lors du passage dans l'étireur à grisms, nous constatons la présence d'un filtrage dans la partie basse du spectre. Il peut s'expliquer par l'écart avec la longueur d'onde de blaze des réseaux ce qui induit inévitablement des pertes. Les traitements antireflets des primes et le comportement spectral du métal (or) qui revêt les réseaux apportent certainement également une contribution à ce comportement. Nous avons bien une compression spectrale dans la fibre T1628C comme attendu. Cependant nous pouvons constater de façon avantageuse que le spectre final est plus large qu'à la sortie du laser ce qui va permettre de produire des impulsions compressées plus courtes.

J'ai mesuré la durée des impulsions par autocorrélation intensimétrique pour une puissance moyenne de 20 mW (Figure 57).

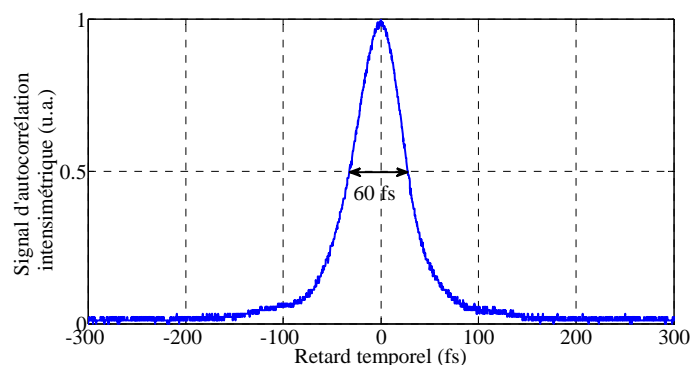


Figure 57 : Trace d'autocorrélation intensimétrique à la sortie de la fibre T1628C ; la durée de cette autocorrélation vaut 60 fs ce qui correspond à une durée d'impulsion de 39 fs, dans l'hypothèse d'un profil d'impulsion en sech^2 .

La fonction d'autocorrélation a une durée $\Delta\tau_{AC}$ égale à 60 fs, correspondant alors à des impulsions de 39 fs ($t_{\text{sech}^2} = \Delta\tau_{AC}/1,55$) dans l'hypothèse d'un profil d'impulsion en sech^2 ou à 42 fs en prenant un profil gaussien ($t_{\text{gaussien}} = \Delta\tau_{AC}/\sqrt{2}$). Le dispositif de déport d'impulsion est donc très efficace. De surcroît nous obtenons, à l'aide de l'élargissement spectral opéré au

sein de la première fibre, une réduction de la durée des impulsions compressées qui sont plus courtes à la sortie qu'à l'entrée du système.

Afin de connaître les limites en puissance du dispositif, j'ai mesuré la durée des impulsions par autocorrélation intensimétrique à la sortie de la fibre T1628C pour différentes valeurs de puissance moyenne présente dans le cœur de la fibre (Figure 58).

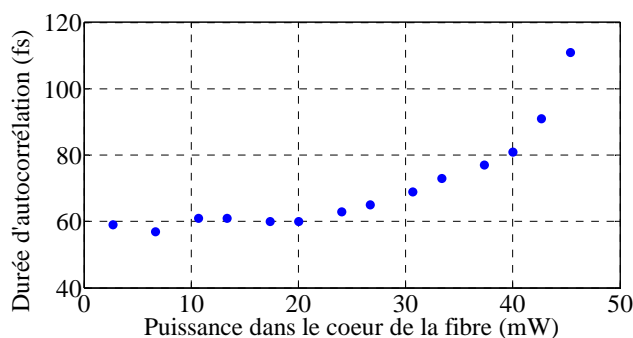


Figure 58 : Evolution de la durée autocorrélation en fonction de la puissance présente dans le cœur de la fibre. Un seul axe propre à polarisation a été excité lors de ces mesures.

On peut noter que lorsque que nous dépassons le seuil des 20 mW dans le cœur central de la fibre à double gaine, la compression spectrale agit de manière notable puisque la durée des impulsions augmente de façon très visible. Toutefois même à 45 mW, nous conservons des impulsions plus courtes que celles délivrées par le laser.

Dans le but de réduire la compression spectrale, il est possible d'exciter simultanément les deux axes propres de la fibre afin de réduire la puissance crête à grâce au dédoublement des impulsions. Cependant la dispersion chromatique étant différente pour les deux modes à polarisation il s'avère impossible avec un unique étireur de comprimer simultanément les deux impulsions correspondantes. A durées identiques, en dédoublant l'impulsion on réduit par 2 le niveau de signal 2PEF produit. Finalement c'est en excitant un unique axe propre de la fibre que l'on produit une réponse non linéaire en 2PEF maximale. Ces éléments justifient l'intérêt de la propriété de maintien de polarisation de la fibre T1628C.

III. Détection en comptage de photons

1. Introduction

En microscopie multiphotonique de table, afin d'améliorer le rapport signal à bruit de la détection et de capter efficacement des flux lumineux faibles, il est possible d'associer le capteur (en l'occurrence un PM H7422P-40 de chez Hamamatsu ; efficacité quantique maximale = 40% @ 580 nm ; 28% @ 400 nm ; faux coups = entre 100 et 300 s⁻¹ ; temps de montée = 1 ns) à un système électronique de comptage de photons ([Ferrand 11], http://www.rp-photonics.com/photon_counting.html). Les dispositifs de comptage de photons qui sont facilement disponibles dans le commerce ne sont pas capables de fonctionner à la cadence d'un oscillateur femtoseconde (i.e. 80 MHz) [Benninger 08]. Nous avons donc fait réaliser sur mesure par la société IKALOGIC (Limoges) une électronique de comptage rapide permettant de discriminer et de compter séparément deux photons consécutifs à une fréquence crête de 100 MHz, c'est-à-dire deux photons séparés temporellement de 10 ns. Le flux photonique moyen est quant à lui de quelques MHz. Ce compteur délivre le nombre de photons compté en le codant sous 8 bits de telle sorte que 256 est la valeur maximale qu'il peut compter. Il possède une entrée d'horloge de remise à zéro qui est typiquement sur 250 kHz lorsque la détection est intégrée aux systèmes d'imagerie par balayage qui seront décrits dans les chapitres suivants. Le compteur possède deux canaux de mesure ce qui permettra un comptage bimodal (SHG + 2PEF) temps réel.

2. Caractérisation du compteur

Afin de comparer notre système de détection dans ses deux modes de fonctionnement, en analogique et en comptage de photons, nous avons réalisé la mesure de l'évolution du rapport signal sur bruit (« signal to noise ratio » en anglais : S/N) en fonction de la puissance d'excitation. L'expérience a consisté à exciter à deux photons de la coumarine très diluée (fluorescence très difficilement visible à l'œil nu) en solution dans de l'éthanol et à détecter sa fluorescence dans la bande 350 nm – 690 nm (ce qui englobe tout le spectre d'émission de ce fluorophore qui est compris entre 425 nm et 650 nm). Nous avons effectué la même mesure pour une détection analogique ou en comptage en utilisant le même photomultiplicateur, celui-ci pouvant être associé à l'un ou l'autre des deux modes de détection, ceci simplement en changeant l'électronique qui est en aval : i) changement d'amplificateur trans-impédance se trouvant juste après le PM : *en analogique*, amplificateur DLPCA-200 à gain et bande réglables de chez FEMTO – le

temps de réponse de l'amplificateur est réglé de telle sorte à être égal au temps alloué à 1 pixel (« dwell time » en anglais) ; *en comptage*, amplificateur rapide HCA-200M-20K-C de chez FEMTO à gain fixe et possédant une bande passante de 200 MHz ; ii) introduction avant l'électronique de comptage en comptage de photons d'un discriminateur : discriminateur TD2000-2400 MHz de chez FAST ComTec à seuil réglable.

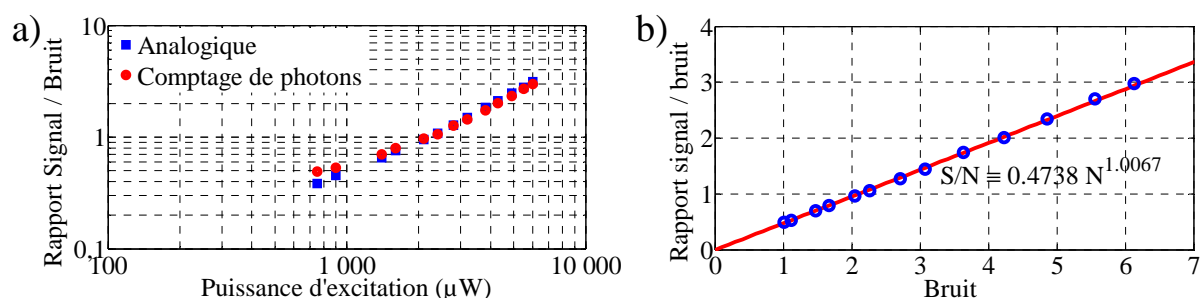


Figure 59 : Tests du système de détection en comptage de photons - (a) : évolution du rapport signal sur bruit S/N en fonction de la puissance d'excitation, pour une détection analogique (bleu) ou en comptage photons (rouge). Le comptage de photon est meilleur pour les faibles puissances et les faibles valeurs de S/N ; (b) : rapport signal à bruit en fonction du bruit en comptage de photons. L'évolution est linéaire mais la pente est inférieure à 1 ce qui veut dire que le système n'est pas limité par le bruit de photon ce qui correspondrait à : $S/N=N=S^{0.5}$ [Ferrand 11]

Le signal, noté S, est la valeur moyenne calculée sur une durée totale de 125 ms sur un ensemble de mesures effectuées toutes les τ secondes, τ désignant le temps alloué à un pixel dans le système d'imagerie par balayage (typiquement $\tau = 4 \mu s$, ce qui donne 31250 mesures). Le bruit, noté N, est l'écart type évalué sur le même ensemble de mesures.

La courbe expérimentale de la Figure 59 (b) donne l'évolution de S/N en fonction de N en comptage de photons. L'évolution est linéaire mais la pente est inférieure à 1 ce qui veut dire que le système n'est pas limité par le bruit de photon ce qui correspondrait à : $S/N=N=S^{0.5}$. Les causes de cette imperfection n'ont malheureusement pas été identifiées au moment où ont eu lieu ces mesures. Il faudrait par exemple tester la stabilité du laser, travailler sur une cible solide pour éviter les éventuelles fluctuations dues à la diffusion dans la solution liquide, ou bien augmenter la concentration de cette solution, réduire la largeur de bande en détection pour tenter d'identifier les sources du bruit qui s'ajoutent au système. Il n'en reste pas moins que le comptage de photon améliore le rapport S/N en comparaison de la détection analogique comme l'indique la Figure 59 (a). Sur cette figure, on peut voir que les modes de détection analogique et en comptage délivrent des valeurs du rapport signal sur bruit qui sont très proches pour des

S/N de quelques unités. Conformément à la théorie [Benninger 08], on constate un avantage notable pour le comptage de photons dans le cas de signaux extrêmement faibles correspondant à des valeurs du rapport signal sur bruit inférieur à 1. A très faible flux le système analogique est pénalisé par la prédominance des faux coups générés par le détecteur.

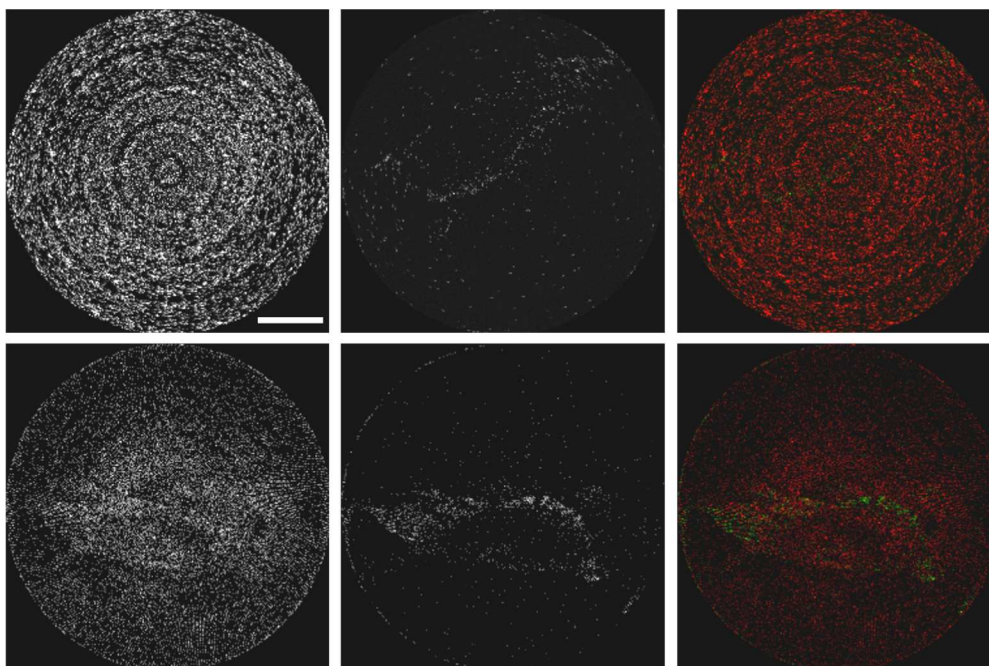


Figure 60 : Comparaison entre détection analogique et détection en comptage de photons. Images brutes, non moyennées, données par l'endomicroscope multiphotonique (voir Chapitre 5 et 6) d'une coupe de rein de souris non marquée, en ex-vivo, pour 2 mW sur les tissus. De la gauche vers la droite : 2PEF, SHG, SHG+2PEF. Haut : détection analogique. Bas : comptage de photons. Barre d'échelle : 50 μ m

La Figure 60 montre un exemple d'utilisation du comptage de photons lors de la formation d'une image biologique avec l'endomicroscope multiphotonique qui sera présenté aux chapitres 5 et 6. Sur les images en comptage de photon le rapport signal à bruit est clairement meilleur ce qui permet de reconnaître la trace d'une artère par l'intermédiaire du collagène qui l'entoure.

Note : les images du haut sont pivotées (approx. 90°) par rapport aux images du bas à cause d'un problème de synchronisation des signaux qui fut résolu par la suite

Bien que sous-optimal le comptage de photons procure une amélioration de l'image. Pour autant cette modalité de détection a été peu utilisée dans les expériences qui vont être exposées à la suite.

Résumé chapitre 3

Le chapitre 2 précédent a permis d'identifier les limitations des endomicroscopes multiphotoniques actuels. Dans ce chapitre 3, nous définissons les choix technologiques innovants qui vont nous permettre de dépasser ces limitations et de coller au cahier des charges qui a été défini au chapitre 1.

La première source d'innovation que nous avons choisie vient de l'emploi d'une fibre optique à double gaine à petit cœur central microstructurée air-silice optimisée pour une utilisation en biophotonique qui a été développée spécialement pour nous par le laboratoire PhLAM de l'Université de Lille 1. Cette fibre a été comparée à des fibres commerciales de gamme équivalente. Cette fibre permet une très forte amélioration de la résolution optique ainsi qu'une optimisation de la collection de la réponse non-linéaire en présence de diffusion de la matière biologique.

La deuxième contribution innovante est propre à XLIM. Elle concerne l'usage d'une solution originale pour la précompensation des distorsions linéaires et non-linéaires introduites par la fibre optique à double gaine à petit cœur. La stratégie de mise en forme spectrale et temporelle qui a été adoptée met en œuvre une première fibre standard pour la gestion des effets non-linéaires qui est associée à un étireur à grisms pour la précompensation de la dispersion chromatique des fibres. Ces deux éléments ont permis l'obtention en sortie de 5 mètres de fibre endoscopique d'impulsions comprimées de durée égale à 39 fs ce qui est plus court qu'en entrée du système au niveau de l'oscillateur femtoseconde qui alimente le dispositif.

Ce chapitre se termine par la présentation du système de détection en comptage de photons rapide qui a été mis au point spécifiquement pour les systèmes d'imagerie qui vont être présentés dans les chapitres suivants.

Chapitre 4 : Mise au point d'un microscope multiphotonique fibré

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était possible de gérer efficacement les distorsions linéaires et non linéaires subies par une impulsion femtoseconde lors de la traversée d'une fibre optique à petit cœur solide et à double gaine dédiée à la biophotonique longue de plusieurs mètres. Avant de nous attaquer à la réalisation d'un véritable endomicroscope multiphotonique à sonde imageuse miniaturisée, nous avons souhaité valider la faisabilité d'un tel projet sur un cas plus simple dans lequel la partie balayage et imagerie optique reste macroscopique. Ceci revient comme nous allons le voir à alimenter la tête d'imagerie par balayage d'un microscope multiphotonique de table par une fibre optique, la source et la détection se trouvant en partie proximale par rapport à la fibre.

I. Présentation du dispositif

La Figure 61 présente le montage expérimental du microscope multiphotonique fibré que j'ai mis au point.

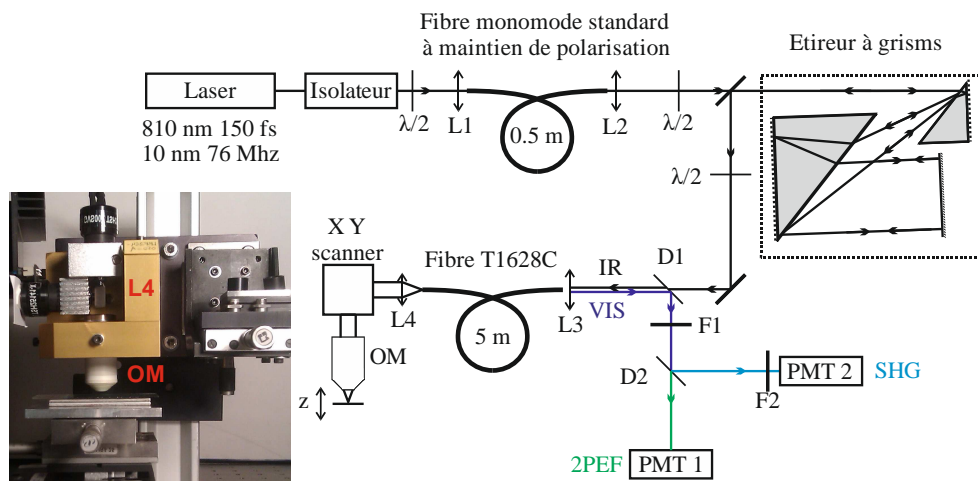


Figure 61 : Schéma expérimental du microscope multiphotonique fibré. $\lambda/2$: lame demi-onde ; Li : lentilles de collimation et de focalisation (L1 : A375TM-B, Thorlabs ; L2 : C110TME-B, Thorlabs ; L3 : C230TME-A, Thorlabs ; L4 : AL2520-A, Thorlabs) ; Di : miroirs dichroïques (D1 : FF705-Di01-25x36, Semrock ; D2 : Di02-R442-25x36, Semrock) ; Fi : filtres (F1 : FF01-720/SP-25, Semrock ; F2 : FF01-405/10-25, Semrock) ; XY scanner : miroirs galvanométriques (GVS 002, Thorlabs) ; OM : Objectif de microscope (W Plan-Apochromat 63x/1.0, Zeiss) ; PMT : Photomultiplicateur (H7422P-40, Hamamatsu).

On retrouve les différents éléments qui ont été introduits aux chapitres précédents, à savoir la source laser (810 nm, 76 MHz, 150 fs), l'isolateur, la première fibre optique pré-compensatrice des effets non-linéaires, l'étireur à grisms pour la pré-compensation de dispersion, ainsi que la fibre endoscopique (T1628C) de 5 mètres de long. A l'extrémité distale de la fibre endoscopique se trouve la tête imageuse d'un microscope à balayage. Cette tête comprend une lentille de collimation, deux miroirs galvanométriques et un objectif de microscope à forte ouverture numérique pour le multiphoton. Le faisceau sortant de la fibre optique est donc collimaté à l'aide de la lentille L4 de focale de 20 mm (voir Figure 61) ce qui produit un faisceau parallèle de 4,5 mm de diamètre mesuré à 5% du maximum. Puis à l'aide d'une paire de miroirs galvanométriques commerciaux (GVS 002, Thorlabs) on impose au faisceau laser une figure de balayage qui se projette au foyer de l'objectif de microscope. Les miroirs de ce scanner sont en argent ($R \approx 98\%$ @ 800nm ; $R \approx 90\%$ @ 400nm) et leur diamètre est supérieur à 8 mm. Les moteurs du scanner, dont la bande passante se situe entre 250 Hz et 1 kHz selon l'amplitude et la forme des signaux qui les excitent, sont alimentés par une électronique dédiée elle-même pilotée par ordinateur à l'aide d'une carte de conversion numérique-analogique (ref. USB 6343 - National Instrument) et du logiciel LabVIEW.

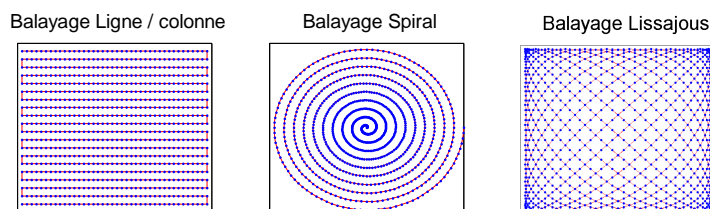


Figure 62 : Exemples de figures de balayage. Rouge : trajectoire du faisceau ; bleu : points échantillonnés à une fréquence temporelle fixe.

Il existe plusieurs possibilités concernant la trajectoire suivie au cours du temps par le spot laser sous l'effet de ce balayage. On peut citer le balayage lignes / colonnes qui est le plus classique et qui permet un échantillonnage homogène du champ (voir Figure 62 - gauche). Il y a le balayage en spirale (voir Figure 62 - milieu) qui produit un échantillonnage dense du centre du champ. Ceci peut être utile dans le cas de l'observation en profondeur d'un échantillon épais au centre du champ de vue et fin sur les bords tel qu'un embryon (Figure 63) [Olivier 10]. Il est également possible d'utiliser un balayage de type Lissajous en envoyant deux signaux sinusoïdaux de fréquences différentes sur les deux miroirs ce qui a pour gros inconvénient de sous-échantillonner le centre du champ (voir Figure 62- droite).

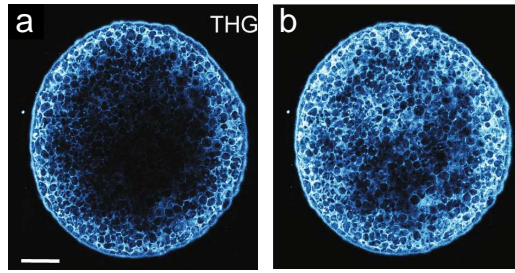


Figure 63 : Image en génération de troisième harmonique en profondeur d'un embryon de poisson zèbre ; (a) : avec un balayage lignes/colonnes ; (b) : avec un balayage en spirale ; barre d'échelle : 100 μ m [Olivier 10].

Nous avons choisi pour le microscope fibré d'utiliser le balayage de type lignes/colonnes afin d'obtenir un balayage homogène. Le faisceau est ensuite focalisé sur l'échantillon grâce à un objectif de microscope commercial optimisé pour la microscopie biphotonique (W Plan-Apochromat 63x/1.0, Zeiss), à immersion à eau, de forte ouverture numérique ($ON = 1$) et de 2,1 mm de distance de travail.

A chaque instant le faisceau laser excite un point de l'échantillon qui émet ou non une réponse. Celle-ci est collectée par le même objectif, en configuration dite d'épi-détection, puis par le cœur ainsi que la gaine collectrice de la fibre endoscopique dans le but d'être réacheminée vers le système de détection à l'aide du miroir dichroïque D1 qui réfléchit efficacement les longueurs d'onde inférieures à 690 nm. Sur cette voie de détection le filtre F1 (densité optique > 7 @ 800 nm ; $T > 95\%$ @ VIS) rejette le reliquat d'infrarouge ayant été réfléchi par D1. Ensuite, le miroir dichroïque D2 définit deux canaux permettant de détecter séparément et simultanément le signal de SHG se situant dans la bande du filtre F2 (400 nm – 410 nm) et les signaux de 2PEF compris dans la bande 465 nm - 690 nm. La détection s'effectue à l'aide de deux photomultiplicateurs identiques (H7422P-40, Hamamatsu ; efficacité quantique maximale = 40% @ 550 nm). Tout le module de détection (mais aussi l'étireur) est à l'intérieur d'une boîte opaque exempte de parasites dus à la lumière ambiante. En détection analogique, chaque PM est suivi d'un amplificateur trans-impédance bas bruit à gain et à bande passante réglable jusqu'à 500 kHz (ref. DLPCA-200 de chez Femto-Messtechnik GmbH). Les PMs fournissent des signaux temporels dont chaque instant correspond à une position sur l'échantillon. Ces signaux sont numérisés à l'aide d'une carte d'acquisition (USB 6343, National Instruments). Puis grâce à au logiciel LabVIEW et à une table de correspondance (en anglais : look-up table, LUT), les deux images correspondantes aux deux canaux de détection sont construites numériquement. Une image bimodale formée de la juxtaposition numérique des deux modalités d'imagerie est enfin synthétisée.

II. Mesure des performances du microscope multiphotonique fibré :

1. Résolution transverse Δx

L'une des caractéristiques principales d'un microscope est sa résolution optique. Nous utilisons un objectif de forte ouverture numérique ($ON = 1$) (W Plan-Apochromat 63x/1.0, Zeiss). Cette valeur d'ON permet de calculer la résolution théorique du microscope biphotonique [Debarre 06]. Ainsi cet objectif devrait théoriquement permettre d'obtenir une résolution latérale d'environ $\Delta x = 0,35 \mu\text{m}$ à 810 nm. De manière expérimentale, en faisant l'image de billes fluorescentes de $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre (voir chapitre 3), j'ai obtenu une résolution transverse égale à $\Delta x = 0,39 \mu\text{m}$ (Figure 64), ce qui est tout à fait cohérent avec la valeur théorique.

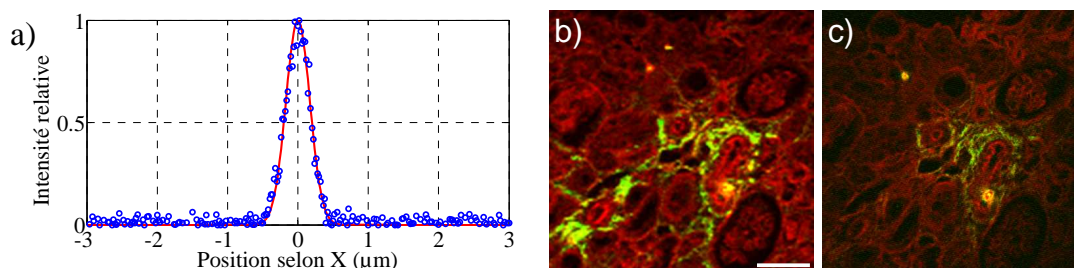


Figure 64 : Résolution : (a) Mesure de la résolution latérale en 2PEF du microscope multiphotonique fibré. Profil diamétral de l'image d'une bille fluorescente de $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre. (b) et (c) images de la même zone d'une coupe de rein de souris non marqué ex-vivo (voir Chapitre 6) données respectivement par un microscope multiphotonique commercial conventionnel non fibré de la marque Olympus appartenant à une autre équipe de XLIM (équipe Electrobiophotonique de la Chaire Santé du Labex SigmaLim) et par notre microscope multiphotonique fibré. Le rapport signal à bruit est plus grand sur l'image (b). Par contre la résolution est clairement meilleure sur l'image (c).

Contrairement au cas d'un microscope multiphotonique de table (non fibré), nous ne disposons pas d'une grande réserve de puissance au foyer du microscope ($P_{\text{max}} = 50 \text{ mW}$) de telle sorte qu'il est nécessaire de limiter au maximum les pertes. Pour cela, j'ai fait en sorte que le faisceau soit de taille légèrement inférieure à la pupille d'entrée de l'objectif (diamètre du faisceau = $4,5 \text{ mm}$ à 5 % du maximum ; pupille d'entrée de l'objectif = 5 mm). Ceci permet de minimiser les pertes par diaphragmation tout en se rapprochant de l'ON nominale de l'objectif et donc de se rapprocher de la résolution transverse maximale (voir ci-dessus). Ceci permet d'expliquer l'écart de 10% entre la valeur calculée et la valeur mesurée de Δx indiquées ci-dessus.

2. Résolution axiale Δz

En ce qui concerne la résolution axiale, la valeur calculée vaut $\Delta z = 0,9 \mu\text{m}$ [Debarre 06]. J'ai réalisé la mesure de cette résolution axiale en utilisant à nouveau des billes fluorescentes de $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre qui ont été translatées axialement à l'aide d'une platine de translation selon l'axe z . La valeur mesurée qui vaut $\Delta z = 2,8 \mu\text{m}$ (voir Figure 65) est notablement différente de la valeur calculée. Lors de cette mesure, le dispositif de positionnement en z n'était pas de qualité optimale, ce qui a pu entraîner des erreurs de mesure. Les formules utilisées pour le calcul de Δz [Debarre 06] sont valables dans l'hypothèse d'un faisceau gaussien. Dans l'expérience que j'ai menée le faisceau provient d'une fibre optique microstructurée dont le profil de mode spatial n'est pas gaussien. Nous n'avons pas trouvé d'autres justifications à l'écart important qui a subsisté entre la valeur calculée et la valeur mesurée de Δz .

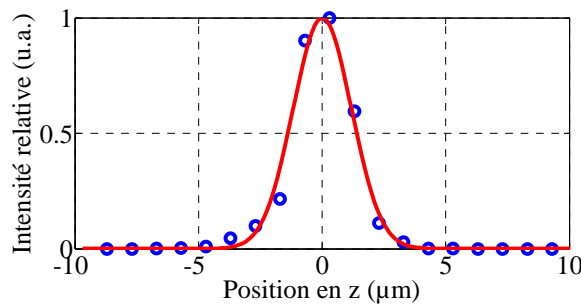


Figure 65 : Mesure de la résolution axiale en 2PEF.

3. Distorsions

L'étape suivante a consisté à vérifier que le dispositif nous permettait d'obtenir une image fidèle de l'objet observé. Pour cela nous avons procédé à l'observation d'objets à la géométrie simple sur lesquels des déformations sont facilement identifiables. Nous avons choisi d'utiliser une mire rectangulaire métallique (R1L3S3P, Thorlabs). L'observation est effectuée en réflectance @ 810 nm et un seul détecteur est requis. Le dichroïque D1, qui est placé en proximal avant la fibre optique et qui sert à extraire la réponse non-linéaire visible provenant de l'échantillon, n'est pas parfaitement transparent à la longueur d'onde d'excitation. Il permet de réfléchir vers le détecteur une faible partie de la lumière infrarouge revenant de la fibre après réflexion sur la mire métallique. Le détecteur qui possède une sensibilité maximale à 550 nm (efficacité quantique $\approx 40\%$ @ 550 nm) garde une certaine sensibilité dans l'infrarouge (effi-

cacité quantique $\approx 10^{-5}$ @ 800 nm) ; il est toutefois nécessaire pour cette expérience d'enlever le filtre F1 (voir Figure 66) servant à rejeter la longueur d'onde d'excitation.

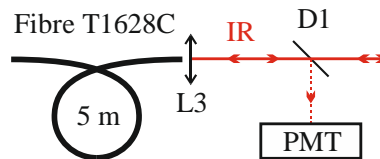


Figure 66 : Configuration de la détection dans le cas de la microscopie en réflectance.

La Figure 67 correspond à l'image de la mire métallique réalisée en réflectance @ 810 nm. Le champ d'observation est de $250 \times 250 \mu\text{m}^2$. On peut voir que l'image n'est pas distordue.

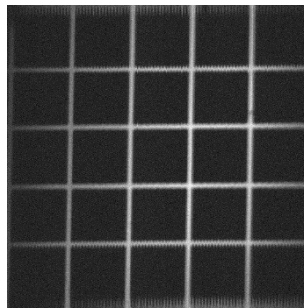


Figure 67 : Image en réflectance d'une grille métallique calibrée de pas égal à $50 \mu\text{m}$ (R1L3S3P, Thorlabs).

III. Exemples d'images données par le microscope multiphotonique fibré :

1. Image en SHG d'un cristal de BBO

L'acquisition d'une réponse non-linéaire provenant d'un tissu biologique non marqué est bien plus délicate que le cas précédent de réflectance d'une cible métallique. Durant la phase de mise au point du microscope multiphotonique, il fut utile de passer progressivement à des cibles de plus en plus difficiles. J'ai ainsi utilisé un cristal doubleur de fréquence optique de BBO (http://en.wikipedia.org/wiki/Barium_borate). Après avoir remplacé les différents filtres devant les détecteurs conformément au schéma de la Figure 61, j'ai obtenu l'image de la Figure 68 de ce cristal donnée par le canal SHG. L'objectif à immersion nécessitant l'ajout d'une goutte d'eau, j'ai utilisé un cristal BBO usagé car ce type de cristal est très sensible à l'humidité d'un point de vue oxydation. Effectivement, nous pouvons constater une nette détérioration de celui-ci sur la Figure 68.

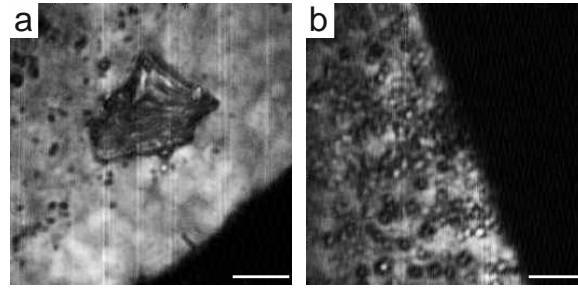


Figure 68 : Image en génération de seconde harmonique d'un cristal doubleur au BBO usagé donnée par le microscope multiphotonique fibré. Barre d'échelle = 50 μm .

2. Image de tendons de queue de rat

Préambule : les exemples d'acquisitions qui sont présentés dans la suite de ce chapitre ont été obtenus au rythme de 1 image/s et avec 500 x 500 pixels²/image.

En microscopie multiphotonique, les tendons de queue de rat sont une des cibles biologiques de référence les plus souvent utilisées. Ceux-ci sont constitués d'une forte concentration de fibres de collagène type I présentant une forte réponse en SHG. Pour cette observation, nous conservons la configuration précédemment utilisée pour le cristal BBO. Les tissus de tendons de queue de rat observés ont été préparés par Mireille Verdier, Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de l'Université de Limoges et membre de l'équipe Homéostasies Cellulaires et Pathologie (EA 3842). Les tissus ont été prélevés puis découpés à une épaisseur d'environ 50 μm au microtome ou bien découpés manuellement donnant une épaisseur de l'ordre de 0,5 mm. Ils n'ont subi aucune fixation ni coloration. Ils ont ensuite été conservés au réfrigérateur avant d'être observés plusieurs semaines après leur prélèvement. La Figure 69 est la toute première image en génération de seconde harmonique acquise à partir de tissus biologiques avec notre dispositif fibré.

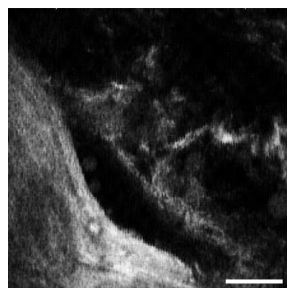


Figure 69 : Image en génération de seconde harmonique de tendons de queue de rat donnée par le microscope fibré équipé de la fibre à gros cœur DC-165-16-passive de NKT-Photonics. On reconnaît l'aspect fibrillaire mais la résolution est clairement sous-optimale. Détection dans la bande 400 nm – 410 nm. Barre d'échelle = 50 μm .

Sur la Figure 69 on arrive à reconnaître l'aspect fibrillaire du tissu. Cependant, cette configuration préliminaire était très sous-optimale dans la mesure où elle utilisait la fibre commerciale DC-165-16-passive de chez NKT- Photonics à gros cœur et non la fibre dédiée du PhLAM T1628C à petit cœur qui fut fabriquée ultérieurement. Par la suite les images qui ont été obtenues avec la version optimale du microscope fibré c'est-à-dire avec la fibre T1628C à petit cœur (voir par exemple la Figure 70). Le gain de résolution entre la Figure 69 et la Figure 70 est clairement visible.

La plupart du temps les acquisitions sur échantillons biologiques ont eu lieu avec entre 15 mW et 30 mW sur les tissus pour un temps d'intégration par pixel valant 4 μ s. Dans ces conditions le rapport signal à bruit est maximal. Cependant j'ai constaté qu'à partir de 1 mW sur les tendons de queue de rat un signal SHG sortant du bruit était visible. A partir de 3 à 4 mW les fibres de collagène sont clairement identifiables en SHG.

Dans le chapitre 1, nous avons évoqué la sensibilité du signal SHG du collagène à la polarisation du signal excitateur infrarouge. La fibre T1628C étant à maintien de polarisation, deux polarisations rectilignes orthogonales sont possibles en agissant sur la dernière lame $\lambda/2$ se situant en position proximale avant la fibre qui alimente la tête imageuse. Les deux axes ne possédant pas la même dispersion chromatique, il est nécessaire d'ajuster légèrement l'étireur à grisms lors du passage d'un axe à l'autre. La réponse en SHG est maximale lorsque la polarisation incidente est colinéaire aux fibres de collagène et elle est minimale lorsque la polarisation est orthogonale aux fibrilles [Williams 05]. On retrouve qualitativement ce comportement sur la Figure 70.

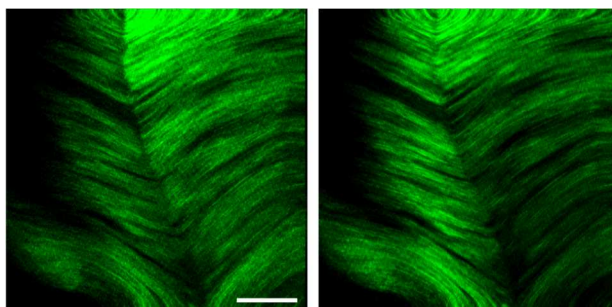


Figure 70 : Image SHG dans la bande 400 nm – 410 nm de tendons de queue de rat selon deux polarisations rectilignes incidentes orthogonales. Barre d'échelle : 50 μ m. Les directions de polarisation incidentes @ 810 nm sont approximativement les suivantes : gauche : ↗, droite : ↘

L'état de polarisation du signal SHG généré par les fibrilles est spécifique et il pourrait être intéressant de l'analyser [Williams 05]. Avant d'être détecté, ce signal effectue un passage par les miroirs galvanométriques métalliques à 45°, puis à la sortie de la fibre, il est réfléchi par le miroir dichroïque D1 qui est également à 45°. Le comportement de ces composants vis-à-vis de la polarisation est relativement simple et il est envisageable de les calibrer. Pourtant, parce que le signal SHG voyage par la gaine très fortement multimode de la fibre optique, il est très vraisemblablement impossible de faire une calibration en polarisation du canal de détection dans son ensemble. Par conséquent il est impossible d'analyser en position proximale la polarisation de la réponse SHG.

3. Images de tissus pulmonaires

Dans le cadre d'une collaboration avec Geneviève Bourg-Heckly du laboratoire Jean Perrin de l'université Pierre et Marie Curie (Paris) et avec le Professeur Luc Thiberville, pneumologue à Clinique Pneumologique de Rouen (ANR « Invivo-ONL » 2009-2011 ; Physicancer « FIMSTO » 2013-2014), nous avons eu accès à des tissus de poumon humain sain se situant au niveau des alvéoles pulmonaires. Ils ont été prélevés sur un patient subissant une chirurgie pour le cancer du poumon lors d'une biopsie dans une zone saine éloignée du cancer. Ils ont été fixés dans du paraformaldéhyde (4 %), puis conservés dans une solution saline. Ils n'ont subi aucune coloration. La matrice extracellulaire de ces tissus pulmonaires est constituée de collagène en concentration bien plus faible que dans les tendons et d'élastine, ces deux constituants ayant respectivement des réponses en SHG et 2PEF. Il a été montré que le collagène n'est pas fluorescent à deux photons lors d'une excitation au-dessus de 800 nm [Peyrot 12] alors que l'élastine donne un spectre de fluorescence maximum à 525 nm.

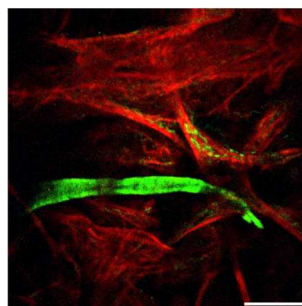


Figure 71 : Image en génération de seconde harmonique (vert) du collagène et en fluorescence à deux photons (rouge) de l'élastine d'un tissu pulmonaire humain sain. Barre d'échelle : 50 μ m.

Les observations sont donc effectuées séparément à l'aide de deux canaux de détection avec un niveau de diaphonie minimal. Comme on peut le voir sur les images (Figure 71), nous arrivons à discriminer efficacement les deux constituants.

4. Imagerie tridimensionnelle en profondeur

Un des points forts de la microscopie multiphotonique est la possibilité d'effectuer des acquisitions en profondeur dans les tissus afin de pouvoir obtenir une représentation en trois dimensions de ceux-ci. Un des échantillons de poumon à notre disposition ayant une épaisseur d'environ 1 mm, nous avons mis en pratique ce point fort. Nous avons pour cela effectué plusieurs acquisitions d'une même zone à différentes profondeurs. Cette fois-ci la gestion de la profondeur d'observation est réalisée par une platine NanoMax haut de gamme commandée par des micromoteurs (MAX343/M, Thorlabs). La Figure 72 présente des acquisitions à différentes profondeurs. Le dispositif nous a permis d'obtenir des images jusqu'à 350 μm sous la surface de l'échantillon pulmonaire. Au-delà de cette profondeur, le signal devient très faible et nécessite des temps d'expositions plus importants. Une recherche d'optimisation de l'étireur selon la profondeur atteinte n'a apporté aucune augmentation du signal. Ceci montre que la matière biologique sur des épaisseurs aussi faibles apporte une contribution négligeable à la dispersion des impulsions excitatrices. Dans cette expérience la polarisation est rectiligne et la puissance sur les tissus est maximale (i.e. 50 mW).

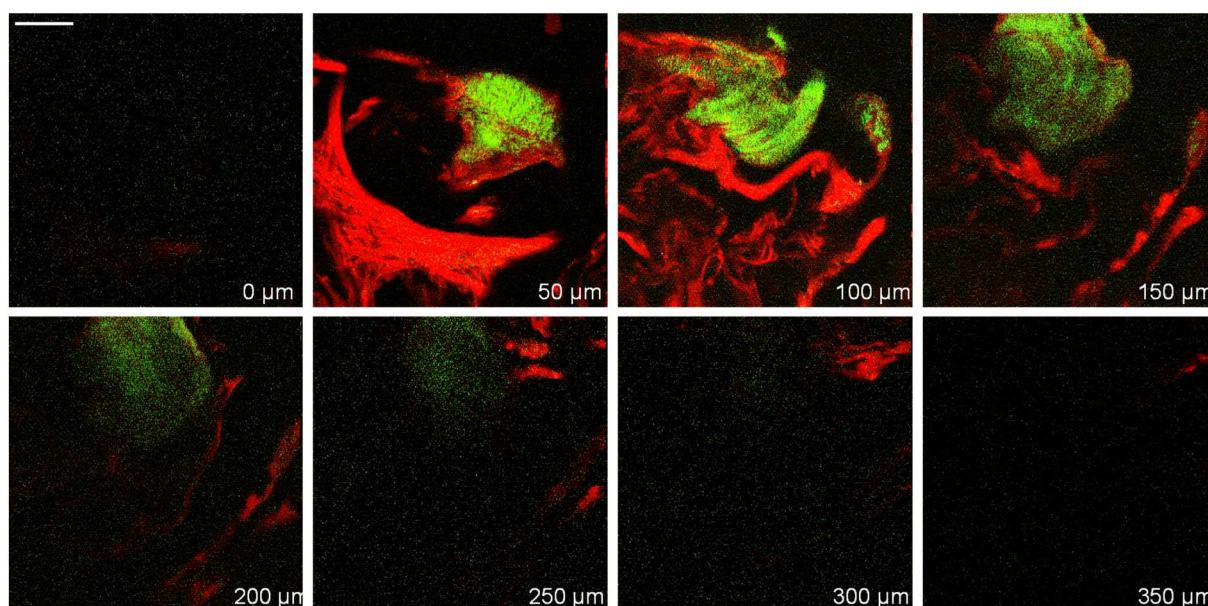


Figure 72 : Image en génération de seconde harmonique et fluorescence à deux photons de tissu pulmonaire sain ; Rouge : réponse en 2PEF (élastine) ; Vert : réponse en SHG (collagène) ; barre d'échelle : 50 μm ; 500x500 pixels²/image ; 1 image/s et 40 μs /pixel.

Grâce à l'association des différentes sections optiques acquises, il est possible de construire une représentation en trois dimensions à l'aide du logiciel ImageJ comme l'indique la Figure 73 :

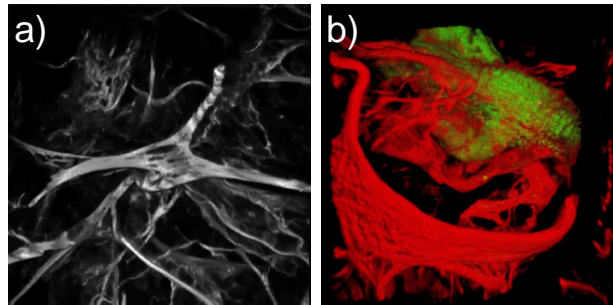


Figure 73 : Images en perspective en trois dimensions de tissus pulmonaires sains ; (a) : image unimodale avec une détection dans la bande 350 nm - 690 nm ; (b) : image bimodale ; rouge : réponse en 2PEF (élastine) dans la bande 465 nm – 690 nm ; vert : réponse en SHG (collagène) dans la bande 400 nm – 410 nm. Profondeur de la perspective = 350 μ m.

Il est également proposé de visionner une vidéo de la rotation de ces deux représentation en trois dimensions des échantillons, en allant aux adresses internet suivantes :

Lien : <http://mediacenter.unilim.fr/videos/?video=MEDIA140724103312109>

Lien : <http://mediacenter.unilim.fr/videos/?video=MEDIA140724102036969>

La Figure 74 présente un autre exemple d'imagerie en profondeur jusqu'à 240 μ m sous la surface du tissu sur tendons de queue de rat en SHG uniquement cette fois-ci.

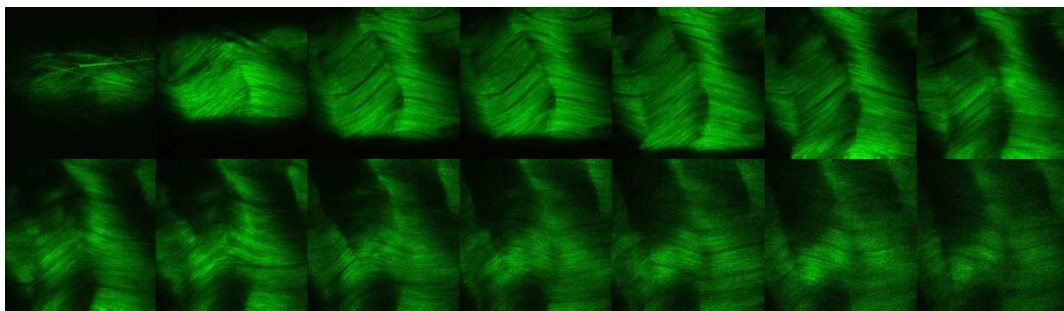


Figure 74 : Images SHG de tendons de queue de rat prises tous les $\Delta z=20$ μ m. En haut à gauche : $z=0$ μ m ; en bas à droite : $z=240$ μ m.

Des acquisitions supplémentaires sont présentées dans l'annexe A.

IV. Perspective applicative : microscope multiphotonique à main

Le microscope multiphotonique fibré qui vient d'être présenté ouvre la porte à de nombreuses perspectives applicatives. On peut imaginer par exemple, en suivant le modèle développé par l'équipe de K. Koenig du JenLab (DermaInspect ; voir Chapitre 1), réaliser l'assemblage des composants précédents dans une tête imageuse compacte munie d'une poignée (voir Figure 75). Cette configuration permettrait d'accéder à diverses parties externes du corps humain, pour une application en dermatologie notamment :

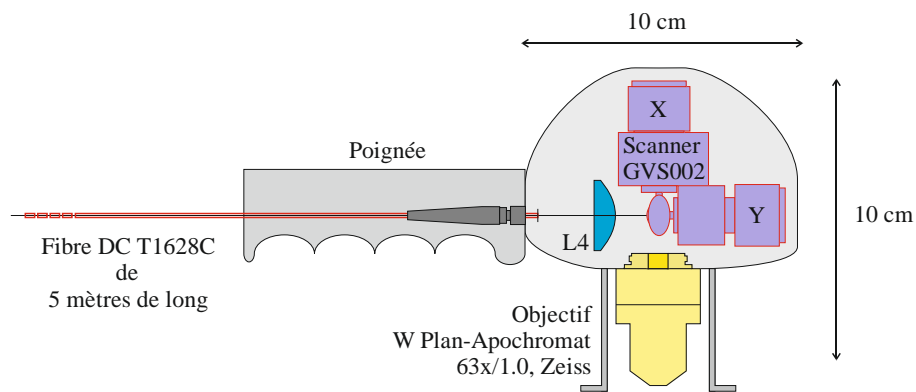


Figure 75 : Perspective applicative : plan d'une version portable du microscope multiphotonique fibré. Tous les composants sont représentés à l'échelle.

Comme nous allons le voir dans le chapitre suivant, il est maintenant possible de procéder au développement d'une sonde miniaturisée pour de l'endomicroscopie multiphotonique permettant l'accès aux zones profondes de l'organisme cette fois-ci.

Résumé chapitre 4

Ce chapitre présente la mise au point d'un microscope multiphotonique fibré dans lequel on retrouve les éléments innovants présentés au chapitre précédent. Il s'agit tout d'abord du module de précompensation des distorsions linéaires et non-linéaires introduites par la fibre optique qui alimente le microscope. La fibre optique microstructurée air-silice à double gaine et petit cœur fabriquée par le PHLAM prend place entre le module précédent et la tête imageuse d'un microscope à balayage de table. En position proximale par rapport à la fibre se trouve le système de détection qui possède un canal pour la 2PEF et un canal pour la SHG. Le système est piloté par ordinateur à l'aide du logiciel Labview et de deux cartes d'interfaçage.

Les caractéristiques du système complet ont été mesurées en détail. Sa résolution latérale vaut $0,39\ \mu\text{m}$ et la profondeur de pénétration sous la surface d'un tissu pulmonaire humain sain non marqué est supérieure à $350\ \mu\text{m}$.

Nous avons pu réaliser d'autres acquisitions sur différents échantillons biologiques non marqués tels que les tendons de queue de rat. Les images ont été obtenues avec des puissances moyennes d'excitation IR inférieures à 30 mW.

Il s'avère donc que cet appareil présente des performances très proches de celles des microscopes multiphotoniques non fibrés commerciaux. Son principal avantage réside dans la possibilité de déporter la tête imageuse à l'extrémité d'une fibre optique très souple de 5 mètres de long. La perspective de fabriquer un microscope multiphotonique portable à main conclut ce chapitre.

Chapitre 5 : Développement d'un endomicroscope multiphotonique

Dans le chapitre précédent, nous avons vu qu'il est possible de réaliser un microscope multiphotonique fibré ayant des caractéristiques similaires à celles des dispositifs commerciaux non fibrés. Pour cela nous avons mis en place un système d'acheminement d'impulsions femtosecondes par fibre optique. Celui-ci est composé d'une première fibre servant au façonnage spectral des impulsions, d'un étireur à grisms permettant de gérer efficacement la dispersion et enfin d'un compresseur constitué d'une fibre optique conçue sur mesure servant à délivrer les impulsions femtosecondes (dans le cœur central de la fibre) mais aussi à récupérer la réponse non linéaire (par la gaine collectrice) produite par l'objet biologique observé. Nous avons associé ce système à un microscope à balayage fait maison réalisé à partir de miroirs galvanométriques et d'un objectif de microscope. Grâce notamment à un interfaçage sous LabVIEW, nous avons obtenu l'acquisition d'images de tissus biologiques non marqués en 2PEF et SHG en simultané.

Dans le but de réaliser un endomicroscope multiphotonique, nous allons maintenant aborder la miniaturisation de la partie imagerie par balayage. Nous commencerons dans un premier temps avec la miniaturisation du système de scanner avant de passer à celle de la partie optique (collimateur et objectif). Ces travaux ont été réalisés en partie en collaboration avec Tigran Mansuryan alors chercheur post-doctorant dans l'équipe Biof³ de XLIM. La partie étude mécanique du scanner à fibre optique a bénéficié de l'expertise de Vincent Pateloup qui est chercheur dans l'équipe Mécatronique de XLIM.

I. Micro-scanner à fibre optique

Nous avons vu précédemment qu'il existe différents dispositifs de balayage miniaturisés (voir : Chapitre 2 : I. 4.). Dans le but de miniaturiser efficacement la sonde endoscopique, nous avons décidé d'utiliser un actuateur piézoélectrique de forme cylindrique (Figure 31), imposant un motif de balayage à un bras de fibre optique, cet ensemble formant le scanner.

1. Architecture du micro-scanner

Les opérations qui ont lieu au sein du scanner sont les suivantes (Figure 76): dans un premier temps, nous synthétisons les signaux de commande à l'aide d'un ordinateur et du logiciel LabVIEW. Ces signaux sont transmis au scanner via une électronique dédiée. Le scanner réagit en conséquence et provoque le déplacement de la fibre optique. Un système de micro-optique (voir : Chapitre 5 : II.) focalise enfin la lumière sur l'échantillon. Comme dans le cas du microscope qui a été décrit au chapitre précédent, la réponse de la cible biologique est collectée par la même fibre optique en épi-détection, puis est mesurée par un détecteur monopixel (PMT). Le détecteur fournit alors une tension dont chaque instant est relatif à une position donnée sur l'échantillon ($M(x,y)$).

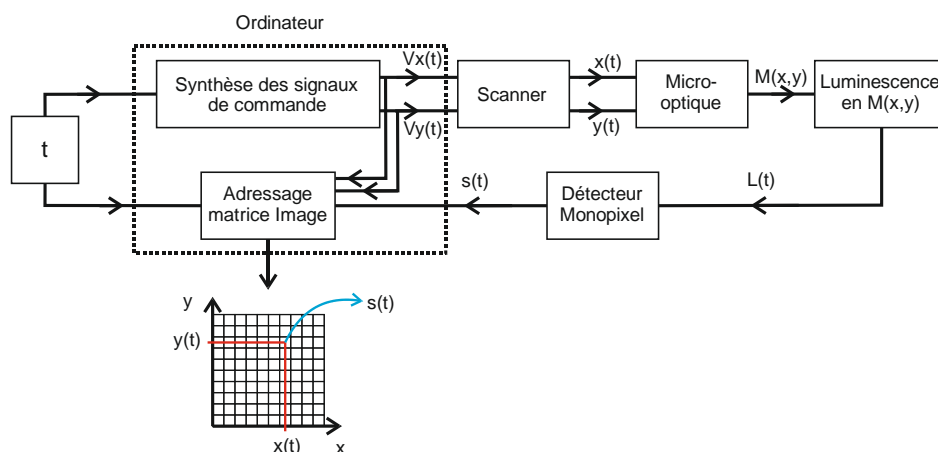


Figure 76 : Architecture du dispositif de balayage.

Compte tenu du niveau de miniaturisation souhaité (diamètre de la tête endoscopique inférieur à 2,5 mm hors tout ; voir cahier des charges défini à la fin du chapitre 1), il n'est pas possible d'ajouter dans la sonde un capteur permettant de connaître la position de la fibre à chaque instant ($x(t)$ et $y(t)$). Par conséquent, le système doit fonctionner en boucle ouverte. Il est donc fondamental d'avoir un scanner fidèle donnant une relation simple et directe entre la commande et la position du spot lumineux sur l'échantillon. Cette relation conditionne la mise en place de la table de correspondance (en anglais : Look-Up Table, LUT) entre les instants et les positions sur l'échantillon. Il est ainsi possible à l'aide de LabVIEW d'adresser rapidement grâce à des fonctions simples (« adresser un tableau », « boucle for », etc. ...) le signal fourni par le détecteur dans la matrice image.

Avant de commencer l'étude de notre scanner, nous rappelons le cahier des charges se rapportant au dispositif d'imagerie miniaturisée :

- une résolution submicronique.
- un champ de vision après focalisation d'environ 250 μm .
- un nombre d'image par seconde raisonnable (> 8 images/s) : imagerie d'échantillons pouvant bouger, ou imagerie de processus rapide.
- des tensions d'alimentations faibles (environ une dizaine de Volt) : pour ne pas électrocuter l'être observé.
- un dispositif miniaturisé : pour être introduit dans le canal opérateur d'un endoscope chirurgical (diamètre < 2.5 mm, longueur < 40 mm).
- un dispositif léger : afin de d'être appliqué à l'imagerie de souris libre de mouvement (< 2 g).
- un dispositif fonctionnant en boucle ouverte fidèle à la commande.
- un dispositif d'imagerie fiable : permettant des périodes d'observation longues.

2. L'actuateur piézoélectrique

a. Présentation générale

Après plusieurs recherches auprès de différents fournisseurs de céramiques piézoélectriques, nous avons sélectionné un modèle commercialisé par la société Physik Instrumente (PI). La céramique retenue est un cylindre creux de 10 mm de long, de 1.5 mm de diamètre externe, et de 0.9 mm de diamètre interne. Elle est produite à partir du matériau PIC255, qui est une céramique polycristalline ferroélectrique possédant des propriétés électro-mécaniques recommandées par le fabricant pour la réalisation d'un actuateur. Elle est définie comme étant du type « solf » ce qui lui confère l'avantage d'être facilement polarisable avec un coefficient de couplage électromécanique important (d_{31} , voir équation (4.1)). Elle est alimentée par quatre électrodes métalliques implantées sur la surface externe du cylindre et parallèles à sa génératrice (voir Figure 76). La céramique possède une 5^{ème} électrode à l'intérieur du tube jouant le rôle de masse (GND). L'actuateur est vendu nu c'est-à-dire avec électrodes mais sans fils de connexion. Il a donc fallu effectuer des microsoudures sur les 4 électrodes afin d'amener les fils de polarisation. Compte tenu de la température de curie relativement élevée du PIC255 (environ 300°C) ces soudures sont possibles sans difficulté notable.

La Figure 77 donne une représentation de l'actuateur dans un repère cartésien (x,y,z). On définit l'axe x (respectivement y) comme étant l'axe reliant les électrodes A et B (respectivement C et D).

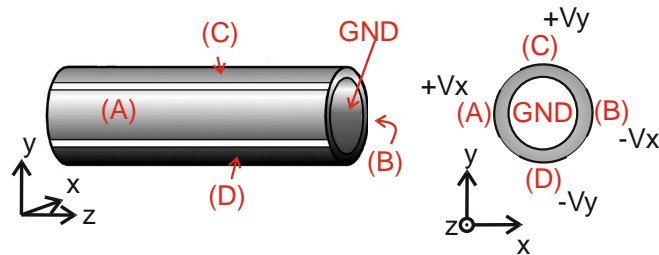


Figure 77 : Schéma de l'actuateur piézoélectrique.

Le volume d'une céramique étant constant, dans le cas simple d'une céramique planaire, on a, selon la tension que l'on applique, une dilatation selon un axe et une compression selon l'autre (Figure 78).

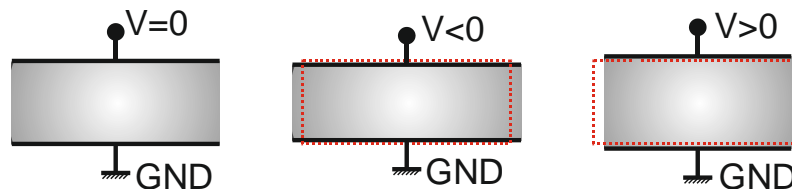


Figure 78 : Déformation d'une céramique planaire selon la tension appliquée.

Pour l'actuateur choisi, les électrodes fonctionnent par paires afin de maximiser la flexion. Par exemple, si nous nous plaçons selon l'axe y (Figure 77 et 78), les électrodes C et D reçoivent des tensions égales en valeur absolue mais de signes opposés (commande bipolaire) (Figure 79). Le long de la génératrice, la céramique se dilate et se comprime respectivement du côté de C et de D. On a alors une flexion vers D de la céramique [Chen 92, Physik Instrumente].

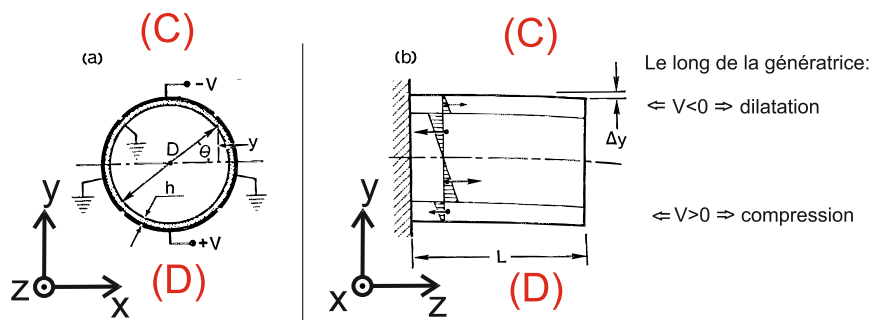


Figure 79 : Déformation d'une céramique cylindrique [Chen 92]

Selon la tension appliquée, nous aurons une déformation plus ou moins importante, ce qui correspond à une commande en position suivant la relation théorique suivante [Chen 92, Physik Instrumente]:

$$\Delta y = 2\sqrt{2} d_{31} \frac{V L^2}{\pi D h} \quad (4.1)$$

avec

- Δy : écart avec la position de repos.
- d_{31} : coefficient du couplage électromécanique, dépendant du matériau constituant la céramique (pour PIC255 : $d_{31} = 180 \text{ pC/N}$).
- L : longueur de la céramique piézoélectrique (10 mm).
- V : tension d'alimentation.
- D : diamètre interne de la céramique piézoélectrique (0,9 mm).
- h : épaisseur de la céramique piézoélectrique (0,3 mm).

Cette équation est valable lorsque nous utilisons une commande bipolaire.

b. Caractérisation

i. Circuit d'alimentation de l'actuateur

Pour le contrôle de l'actionnement de la céramique, nous passons par le logiciel LabVIEW (National Instruments) qui nous permet de générer quatre signaux (une tension par électrode) compris entre -10 et +10 V grâce à un convertisseur numérique analogique (USB 6343, National Instruments). Afin d'apporter les niveaux de tension nécessaires au bon fonctionnement de la céramique, nous amplifions ces signaux à l'aide d'amplificateurs E-835.00 (PI) qui nous ont été recommandés par Physik Instrumente. La première étape est de contrôler le bon fonctionnement des amplificateurs. Pour cela nous réalisons une étude de la réponse en tension et en fréquence (Figure 80).

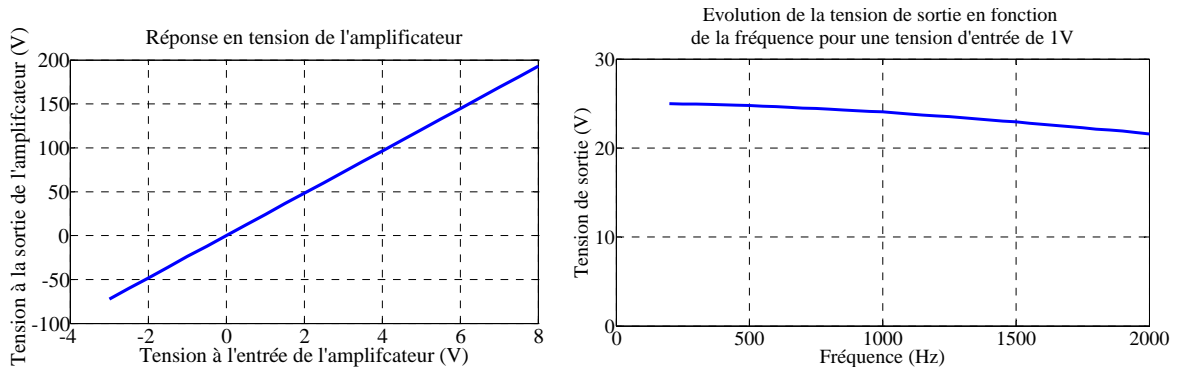


Figure 80 : Réponse de l'amplificateur E835.00 (PI).

La tension de sortie de l'amplificateur évolue linéairement suivant la tension d'entrée avec un gain de 25 et ce sur une large bande passante.

ii. Caractérisation de l'actuateur

• Etude statique

Nous nous intéressons ici à la déflexion de l'actuateur qui a été mesurée à l'aide d'un microscope optique (Olympus IX71). On peut voir sur la Figure 81, que la loi théorique de déplacement est correctement respectée.

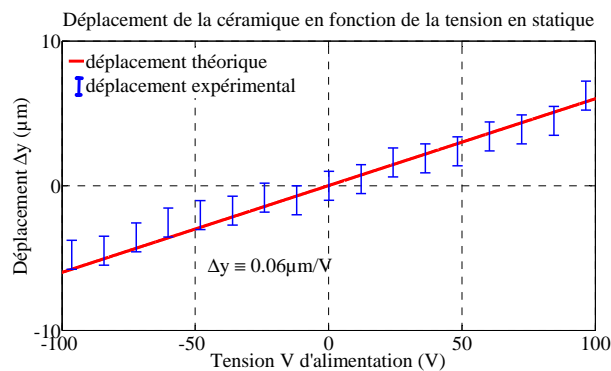


Figure 81 : Réponse de la céramique en statique.

Les céramiques piézoélectriques de type polycristallin ferroélectrique présentent de l'hystérésis. On peut voir ce phénomène sur la Figure 82, qui présente les mesures du déplacement lors de l'excitation croissante puis décroissante de la céramique.

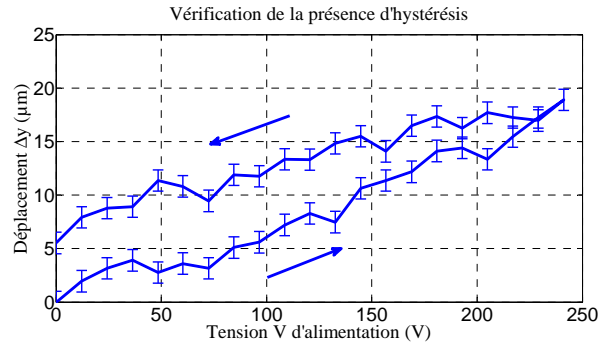


Figure 82 : Vérification de la présence d'hystérésis

• Etude dynamique

Pour préparer la mise au point du scanner, dont nous verrons qu'il fonctionnera à une fréquence de l'ordre de 1kHz, il a été utile d'effectuer une étude dynamique de la réponse de la céramique. La Figure 83 montre que la céramique possède une réponse constante sur une large bande d'utilisation. Les fréquences qui seront utilisées sont éloignées de la résonance propre de la céramique elle-même qui se situe plus haut sur l'axe fréquentiel.

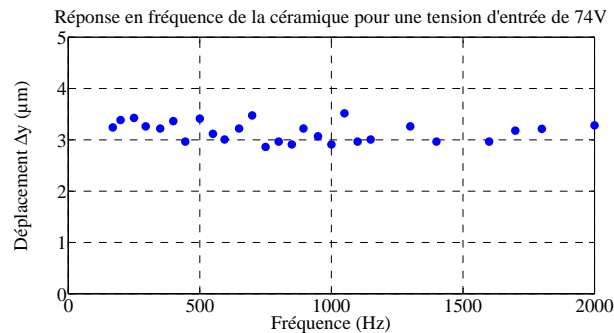


Figure 83 : Réponse en fréquence de la céramique.

On constate que la déflexion de l'actuateur est de l'ordre du micromètre. Même en ne tenant pas compte de la micro-optique se trouvant entre le scanner et le champ à imager et dont nous verrons qu'elle apporte un grandissement plus petit que 1 (voir Chapitre 5 : II.), le champ attendu de 250 μm n'est pas du tout accessible avec un déplacement aussi faible. Il est nécessaire d'avoir recours à un effet d'amplification mécanique de l'amplitude du mouvement de la fibre optique par rapport à celui de l'actuateur. Cet effet est permis grâce à la résonance mécanique de la fibre optique que je vais maintenant décrire.

3. Résonateur à fibre optique

Nous allons donc maintenant nous intéresser à la résonance mécanique de l'extrémité de la fibre optique [Binnig 86, Helmchen 13, Roberts 00, Zhang 14]. Dans un premier temps nous allons considérer la résonance de la fibre indépendamment de l'excitation venant de l'actuateur.

a. Présentation du résonateur mécanique

En première approche, on peut définir le bras de fibre optique comme une poutre cylindrique en silice pleine encastrée à une de ses extrémités et libre à l'autre (côté droit sur la Figure 84). Afin d'exciter ce résonateur, l'encastrement est déplacé parallèlement à lui-même par l'actuateur de manière transverse à la fibre.

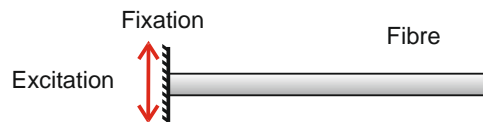


Figure 84 : Résonateur mécanique.

Il s'agit d'un oscillateur harmonique faiblement amorti dont la fréquence de résonance f_r est telle que [Bruhat 61, Roberts 00] :

$$f_r = \frac{\beta}{4\pi L^2} \sqrt{\frac{ER^2}{\rho}} \quad (4.2)$$

avec :

- β : constante dépend de l'ordre du mode de résonance utilisé et des conditions aux limites ($\beta_{\text{mode fondamental}} = 3,52$, $\beta_{1\text{er harmonique}} = 22,4$).
- E : module d'Young de la silice ($E = 7,17 \text{ GPa}$) [Roberts 00].
- R : rayon de la fibre.
- L : longueur du bras de fibre.
- ρ : masse volumique de la fibre ($\rho = 2\,700 \text{ Kg/m}^3$).

b. Fréquence de résonance du scanner à fibre microstructurée air-silice

La Figure 85 présente, à titre de vérification de la formule précédente, la comparaison entre le modèle théorique et l'expérience au niveau de l'évolution de la fréquence de résonance en fonction de la longueur libre pour une fibre standard de 125 μm de diamètre. Lors de cette expérience le résonateur est excité par un pot vibrant alimenté par un générateur de fonction basse fréquence. On peut remarquer que les deux résultats sont très proches. On peut relier l'écart entre ces courbes à l'incertitude sur la mesure de la longueur exacte du bras de fibre (définition du point de fixation imprécise).

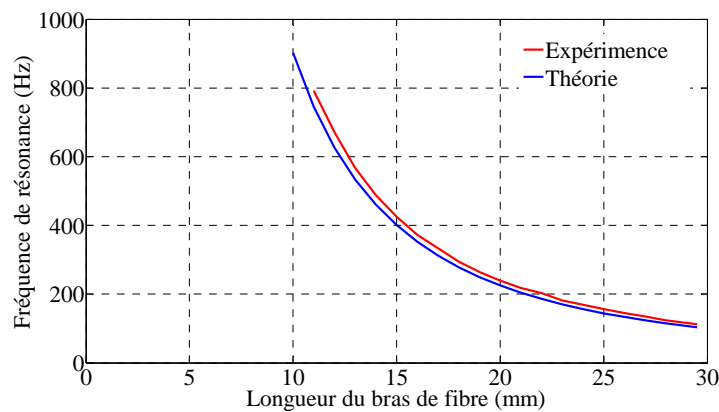


Figure 85 : Evolution de la fréquence de résonance en fonction de la longueur du bras de fibre, pour une fibre standard de diamètre égal à 125 μm ; données expérimentales et théoriques.

Le modèle théorique précédent est valable pour un barreau de silice plein. Or la fibre que nous allons utiliser pour l'endomicroscope est une fibre microstructurée air-silice inhomogène présentant de nombreux canaux d'air parcourant toute la longueur de la fibre (voir Chapitre 3). En préambule à la fabrication de cette fibre innovante, nous avons voulu connaître l'influence de la présence de canaux d'air sur la fréquence de résonance mécanique de la fibre afin de voir s'il était nécessaire d'adapter la géométrie de la fibre optique. Grâce à la collaboration avec Alexandre Kudlinski du laboratoire PhLAM, nous avons pu tester, avant la fabrication de la fibre finale (T1628C), deux fibres optiques microstructurées de même type (Figure 86). La première d'un diamètre de 133 μm présente une couronne d'air à sa périphérie (design 938Cf, PhLAM). La seconde a un diamètre de 330 μm et est microstructurée en son centre (design 924Df, PhLAM).

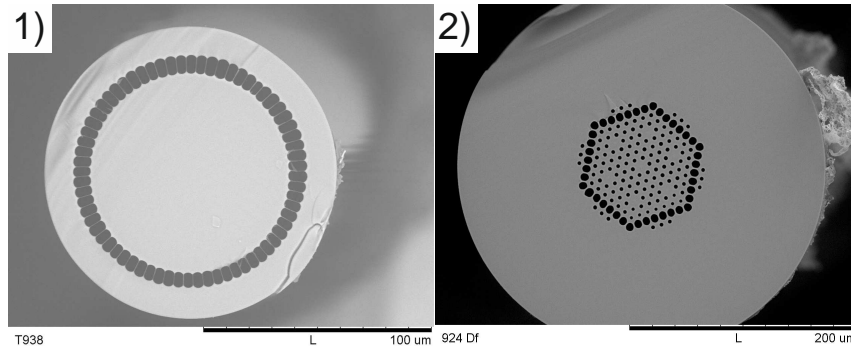


Figure 86 : Fibres utilisées pour vérifier l'influence de la microstructure sur la fréquence de résonance ; 1) : 938Cf, 2) : 924Df.

La Figure 87 présente les résultats obtenus pour les deux fibres. Les courbes théoriques correspondent à des fibres en silice pleine sans canaux d'air de diamètre externe respectivement de 133 μm et de 330 μm . On peut voir que dans le cas des deux fibres étudiées, l'ajout de trous d'air n'a pas changé de façon significative la fréquence de résonance. La fréquence de résonance de la fibre est surtout conditionnée par la dernière couronne de matière se trouvant en périphérie loin de l'axe. Ceci est cohérent avec le fait que les propriétés de résonance d'une poutre de section inhomogène dépendent de son moment quadratique qui dépend lui-même des distances à l'axe élevées à la puissance 4 (http://fr.wikipedia.org/wiki/Moment_quadratique).

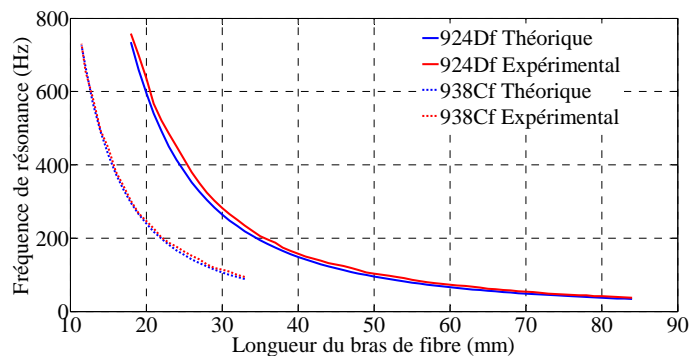


Figure 87 : Evolution de la fréquence de résonance en fonction de la longueur pour les fibres 924Dfn et 938Cf ; données expérimentales et théoriques.

La fréquence de résonance des fibres microstructurées air-silice est donc, comme pour les fibres standards, fixée par les paramètres géométriques simples que sont son diamètre externe et sa longueur.

c. Caractérisation du résonateur

Suite aux premières caractérisations qui viennent d'être présentées, nous avons réalisé l'assemblage de la céramique piézoélectrique et de la fibre optique endoscopique à double gaine (T1628C, PhLAM). Cette étape technologique a demandé de nombreux efforts ayant concerné entre autres le choix des matériaux formant le support, de la colle utilisée pour les fixations, des différentes micro-pièces d'adaptation ainsi que le câblage de l'actuateur. La longueur du bras de fibre a été fixée à 11,5 mm.

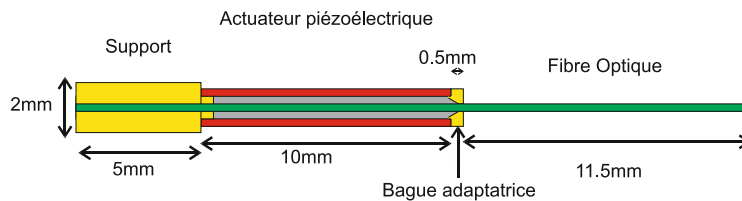


Figure 88 : Plan du dispositif de balayage

Par ailleurs, pour la définition des conditions optimales d'excitation du micro-scanner, nous avons bénéficié des informations fournies par une étude numérique qui a été menée par Vincent Pateloup de l'équipe Mécatronique de XLIM. Cette étude a consisté à simuler la résonance de la fibre à l'aide du logiciel CATIA (Dassault Systèmes) qui fait ce calcul par la méthode des éléments finis.

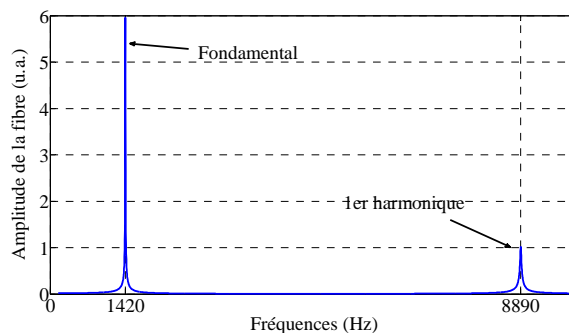


Figure 89 : Fréquences de résonance théoriques pour un bras de fibre de 11.5mm. La réponse du 1^{er} harmonique est 6 fois plus faible que celle du fondamental.

La Figure 89 montre l'existence de plusieurs modes de résonance. On constate que la réponse du 1^{er} harmonique est 6 fois plus faible que celle du fondamental. Dans le but d'obtenir un champ balayé le plus grand possible pour des tensions envoyées à l'actuateur réduites, nous avons par conséquent choisi d'utiliser le mode le plus efficace c'est-à-dire le mode fondamental.

Connaissant la fréquence de résonance théorique du bras de fibre ($F_{rt} = 1420$ Hz), j'ai réalisé le test expérimental de la sonde assemblée (voir Figure 88), en alimentant au voisinage de cette fréquence un seul axe de la céramique actuatrice (V_x ou V_y). Lors de ce test préliminaire, il est nécessaire d'ajuster la fréquence d'excitation afin de trouver précisément la résonance du fait de l'inévitable écart résiduel entre fréquence théorique et fréquence vraie. Pour cela, on injecte de la lumière dans le cœur de la fibre, puis du côté de la céramique on image la face de sortie de la fibre sur une caméra afin de relever la trace de la fibre. L'excitation se faisant uniquement sur un axe durant cette expérience, le balayage attendu doit être un segment de droite parallèle à l'axe d'excitation. Ceci est vrai en dehors de la résonance (Figure 90). Ces trajectoires rectilignes de faible amplitude hors résonance permettent de repérer les axes d'actuation x et y sur la caméra.

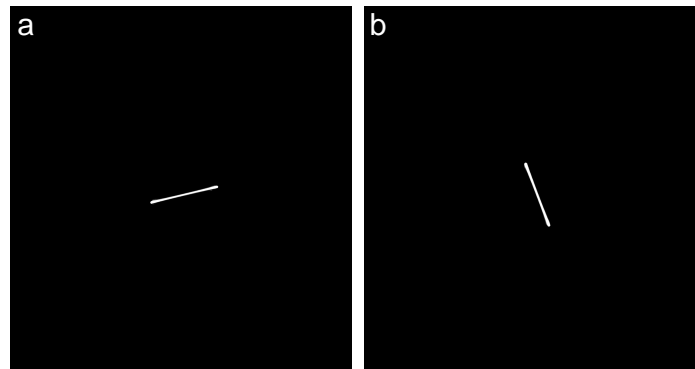


Figure 90 : Trajectoire suivie par la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe en dehors de la résonance ; (a) : excitation selon x ; (b) : excitation selon y .

Lorsqu'on se rapproche de la fréquence de résonance, l'amplitude augmente et nous obtenons la trajectoire tourbillonnante de la Figure 91, ceci bien que n'excitant qu'un seul axe.

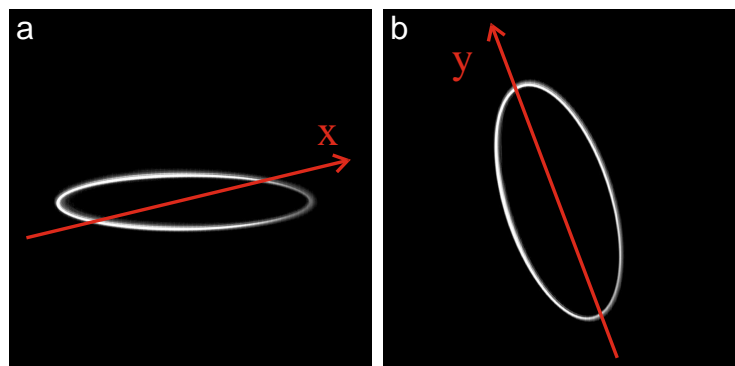


Figure 91 : Trajectoire tourbillonnante suivie par la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe à la résonance ($f_r=1415$ Hz) ; (a) : excitation selon x ; (b) : excitation selon y ; rouge : axes réels, x et y , de la céramique piézoélectrique

Malgré cet effet inattendu, j'ai mesuré la réponse en fréquence de la fibre sur chacun des axes. Nous pourrions ainsi extraire de ces mesures la fréquence de résonance exacte sur chaque axe ainsi que le facteur de qualité de la sonde. Ce dernier est lié aux pertes mécaniques du système résonant (frottement, échauffement, hystérésis de la céramique piézoélectrique). Plus sa valeur est élevée, moins il y aura d'amortissement, et plus l'amplitude à la résonance sera importante [Rigaud 03]. Le facteur de qualité est défini par :

$$Q = \frac{f_r}{\Delta f} = \frac{x(f = f_r)}{x(f = 0)} = \frac{x_{max}}{x_0} \quad (4.3)$$

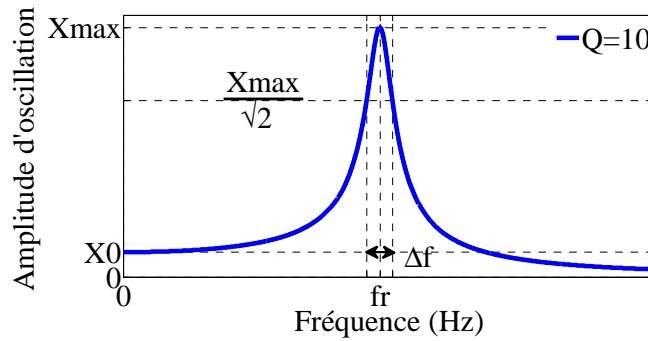


Figure 92 : Courbe de résonance théorique.

f_r est la fréquence de résonance ; Δf est la bande de résonance définie par une atténuation du débattement d'un facteur $\sqrt{2}$ (soit 3dB en amplitude) ; x correspond au débattement du résonateur ; x_{max} et x_0 représentent respectivement l'amplitude d'oscillation maximale et celle à la fréquence nulle qui correspond au déplacement de l'actuateur.

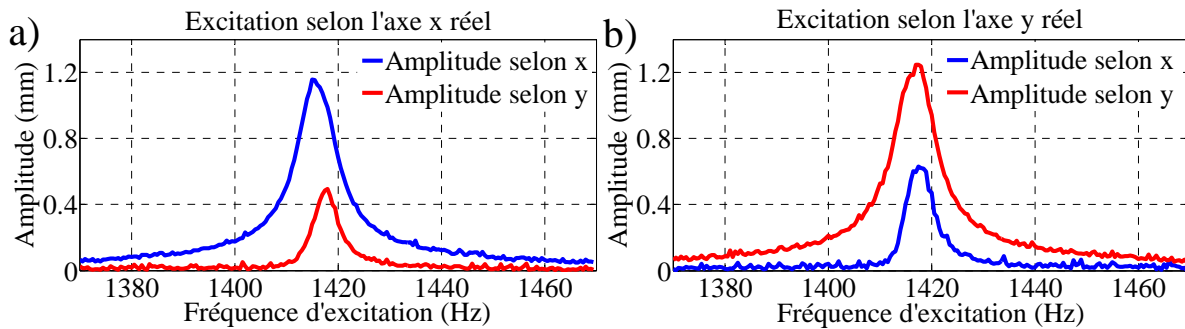


Figure 93 : Amplitude d'oscillation de l'extrémité de la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe ; (a) excitation selon x ; (b) excitation selon y.

i. Anisotropie du résonateur

La Figure 93 met en évidence la présence d'un écart entre les fréquences de résonance qui apparaissent sur chacun des deux axes de commande ($f_r = 1415$ Hz pour l'axe x, $f_r = 1418$ Hz

pour y). Nous constatons de plus que les amplitudes maximales de chaque axe sont différentes ($x_{\max} = 1154 \mu\text{m}$, $y_{\max} = 1248 \mu\text{m}$).

Nous relevons une bande de résonance Δf d'environ 7 Hz. Le facteur de qualité mesuré vaut 200 (pour x et y). Il est à noter que ce facteur de qualité est très supérieur à l'état de l'art publié dans la littérature relativement à ce type de micro-scanner à fibre optique (exemple : $Q = 60$ dans [Zhang 14] ; $Q = 110$ dans [Kundrat 11]).

ii. Couplages entre les 2 axes de commande

Il existe un fort couplage entre les deux axes dans la bande Δf , de telle sorte que la fibre ne suit pas la commande. Ce couplage est dû à une légère asymétrie du dispositif, se situant surtout vraisemblablement au niveau des électrodes métalliques qui sont implantées de façon imparfaite sur la céramique cylindrique et peut-être aussi au niveau du point de colle qui solidarise la fibre et la céramique.

d. Recherche du mode d'excitation optimal

Ce résonateur mécanique possède néanmoins deux axes propres indépendants, restant à identifier, dont l'orientation ne correspond pas à celle des électrodes. Il a été proposé par l'équipe de E.J. Seibel qui est le spécialiste mondial de ce type de micro-scanner à fibre optique, de passer à l'emploi d'électrodes virtuelles (V_X, V_Y) afin d'exciter le dispositif sur ses axes propres mécaniques.

J'ai utilisé et approfondi cette notion qui est proposée de façon peu détaillée dans [Kundrat 11]. Les électrodes virtuelles, X et Y, qui correspondent à une combinaison linéaire des deux électrodes réelles, x et y (voir Figure 94) sont définies par :

$$\vec{e}_X = \cos(\theta) \vec{e}_x + \sin(\theta) \vec{e}_y \quad (4.4)$$

$$\vec{e}_Y = -\sin(\theta) \vec{e}_x + \cos(\theta) \vec{e}_y \quad (4.5)$$

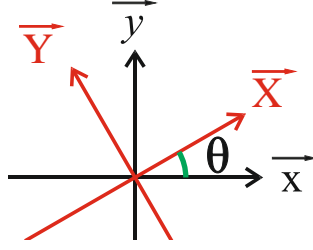


Figure 94 : Axes du système. \vec{x} et \vec{y} : axes définis par les électrodes réelles ; \vec{X} et \vec{Y} : axes définis par les électrodes virtuelles correspondant aux axes propres du résonateur.

On note respectivement (V_x, V_y) et (V_X, V_Y) les tensions appliquées sur les électrodes réelles et virtuelles. Afin de déterminer la valeur de l'angle θ , on se place dans le cas d'une tension sinusoïdale appliquée uniquement sur l'axe \vec{X} , telle que :

$$V_X(t) = \cos(\omega t) \quad (4.6)$$

$$V_Y(t) = 0 \quad (4.7)$$

Ceci est obtenu en appliquant les tensions réelles :

$$\text{Sur } x : V_x(t) = \cos(\omega t) \cos(\theta) \quad (4.8)$$

$$\text{Sur } y : V_y(t) = \cos(\omega t) \sin(\theta) \quad (4.9)$$

Ensuite on fait varier la valeur de θ , tout en observant l'effet produit sur la forme de la trajectoire à l'aide de la caméra. Lorsque θ est égale à zéro, on est dans le cas d'une excitation sur l'axe \vec{x} ce qui donne à la résonance une trajectoire elliptique. Partant de cette valeur on cherche la valeur de θ donnant une trajectoire rectiligne. La Figure 95 présente la trajectoire de la fibre avant et après optimisation de la valeur de θ ($\theta = 0.5585 \text{ rad} = 32^\circ$). Afin de vérifier ce résultat, on réalise la même expérience sur l'axe \vec{Y} , on obtient alors la même valeur de θ .

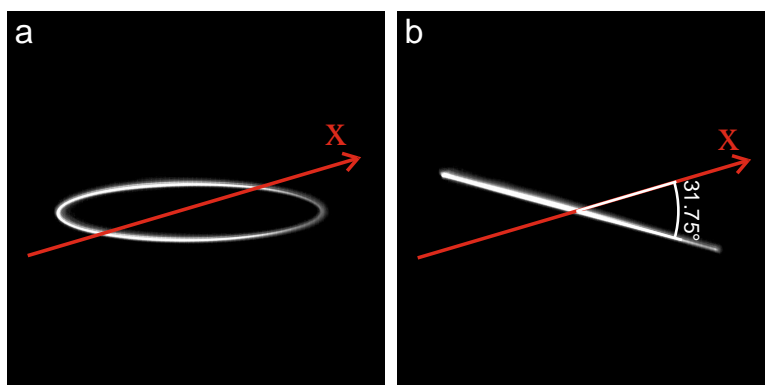


Figure 95 : Balayage effectué par la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe (a) en utilisant un axe réel. (b) en utilisant un axe virtuel.

On peut mesurer directement sur la Figure 95 l'angle entre l'axe \vec{x} et l'axe \vec{X} . Il vaut 31.75° ce qui correspond très bien, aux erreurs de mesures près, à la valeur de θ utilisée pour synthétiser les signaux de commande.

La correction apportée par l'utilisation des électrodes virtuelles permet d'obtenir une trajectoire parfaitement rectiligne. Maintenant que les axes propres du système mécanique sont déterminés, on peut vérifier leur orthogonalité. Pour cela on superpose les acquisitions effectuées séparément sur l'axe \vec{X} et \vec{Y} (Figure 96). On retrouve bien deux axes orthogonaux entre eux.

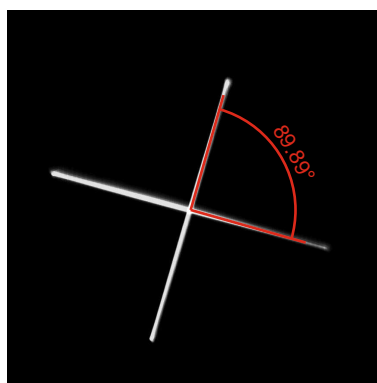


Figure 96 : Superposition des deux axes virtuels.

La Figure 97 présente la réponse en fréquence de l'axe \vec{X} et de l'axe \vec{Y} lors de l'excitation respectivement des électrodes V_X et V_Y . Les deux axes virtuels présentent deux fréquences de résonance différentes ($fr_X = 1415 \text{ Hz}$; $\Delta fr_X = 6 \text{ Hz}$; $fr_Y = 1417,5 \text{ Hz}$; $\Delta fr_Y = 6 \text{ Hz}$). On verra dans la suite de ce chapitre, que le balayage choisi est de type spiral. Pour cela et afin de conserver une amplitude importante sur les deux axes, on utilise la fréquence médiane ($f=1416 \text{ Hz}$). Dans cette situation, on profite de 89% de l'amplitude maximale obtenue à la résonance.

Suite à l'utilisation des axes virtuels, le facteur de qualité du dispositif a évolué. Il est maintenant d'environ 236 pour chacun des deux axes (précédemment : $Q = 200$).

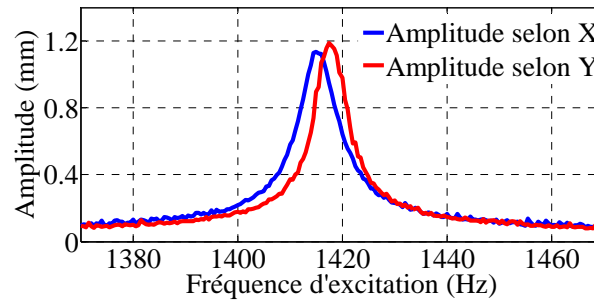


Figure 97 : Réponse en fréquence lors de l'excitation sur les axes virtuels ; **Bleu** : excitation de V_X ; **Rouge** : excitation de V_Y ; $fr_X = 1415$ Hz ; $fr_Y = 1417,5$ Hz.

Afin de confirmer l'utilité des axes virtuels, on impose maintenant au système deux signaux sinusoïdaux $V_X(t)$ et $V_Y(t)$ en phase afin de produire une trajectoire rectiligne inclinée en dehors des axes propres :

$$V_X(t) = \cos(\omega t) \quad (4.10)$$

$$V_Y(t) = \cos(\omega t) \quad (4.11)$$

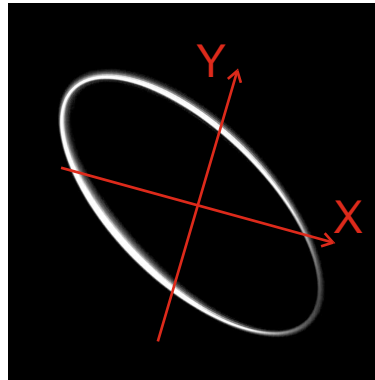


Figure 98 : Obtention d'une trajectoire elliptique malgré l'utilisation de signaux de commande en phase.

La trajectoire obtenue n'est pas celle attendue (Figure 98). Comme pour tout oscillateur, le phénomène de résonance s'accompagne d'un déphasage entre la commande et la réponse qui est plus ou moins important selon la position par rapport à la résonance [Helmchen 01, Rigaud 03]. Ce déphasage évolue en fonction de la fréquence utilisée dans la bande de résonance, avec un passage par $-\pi/2$ à la fréquence de résonance et un glissement de phase de part et d'autre de la résonance égal à $-\pi$.

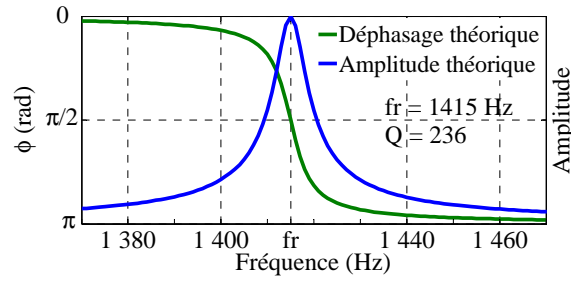


Figure 99 : Evolution théorique du déphasage en fonction de la fréquence.

Les deux axes n'ayant pas la même fréquence de résonance, ce déphasage est différent sur chacun d'eux. Il est nécessaire de tenir compte de ce déphasage différentiel entre les deux axes. La Figure 100 représente le déphasage théorique entre les deux axes.

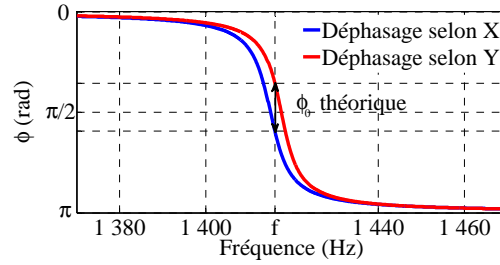


Figure 100 : Déphasage théorique entre les axes \vec{X} et \vec{Y} ; $f_{rX}=1415$ Hz ; $f_{rY}=1417,5$ Hz ; $Q=236$; $\Phi_0 \text{ théorique} = 0.751$ rad soit 43° à 1416 Hz.

Afin de compenser cet effet il suffit de déphaser les deux commandes (Figure 101) :

$$V_X(t) = \cos(\omega t) \quad (4.12)$$

$$V_Y(t) = \cos(\omega t + \Phi_0) \quad (4.13)$$

La valeur de Φ_0 est déterminée expérimentalement de manière itérative en partant de la valeur théorique et en relevant l'évolution de la trajectoire de la fibre optique en fonction de la phase utilisée.

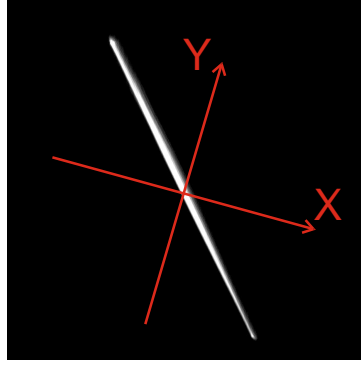


Figure 101 : Mise en phase des axes d'excitation virtuels. $\Phi_0 = 0.6$ rad soit 34.4°

Les valeurs théorique et expérimentale de ce déphasage sont relativement proches. L'écart entre elles est vraisemblablement dû au fait que ce déphasage varie très vite et qu'il y a eu des imprécisions de mesure concernant les fréquences de résonance et le facteur de qualité de chaque axe. Il n'en reste pas moins que la démarche expérimentale est très efficace.

Enfin, en guise de vérification ultime, nous avons cherché à obtenir un balayage circulaire :

$$V_X(t) = \cos(\omega t) \quad (4.14)$$

$$V_Y(t) = \sin(\omega t + \Phi_0) \quad (4.15)$$

Comme on peut le voir sur la Figure 102 a), nous obtenons une ellipse orientée selon les axes propres. La fréquence d'excitation n'étant pas exactement la fréquence médiane entre les deux modes, l'amplitude pour chaque axe n'est pas exactement la même. Il faut ajuster le poids de chacun à l'aide d'un simple coefficient d'amplitude ce qui permet d'obtenir le résultat indiqué sur la Figure 102 b).

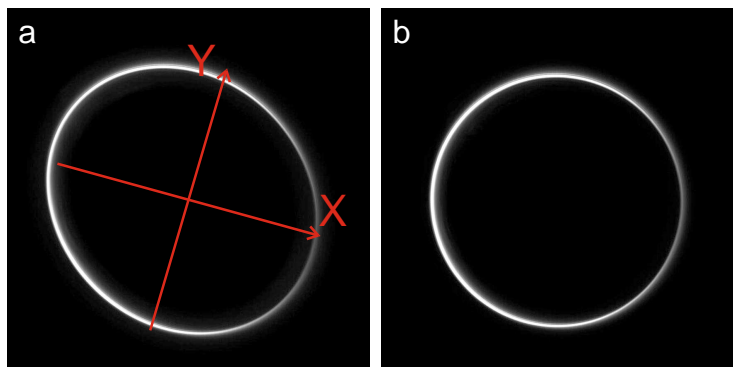


Figure 102 : Balayage circulaire (a) avant, (b) après l'ajustement des poids des deux axes.

A partir de maintenant, on travaille exclusivement avec les axes propres \vec{X} et \vec{Y} .

4. Mise en œuvre du micro-scanner pour la formation d'une image par balayage

Préambule : comme nous venons de le voir, un système résonant est toujours associé à une fréquence imposée et à une bande passante étroite. L'utilisation d'un dispositif de balayage doublement résonnant (selon x et selon y) présente alors des contraintes inhérentes à son fonctionnement. Contrairement au microscope présenté au chapitre 4, qui est équipé d'un système de miroirs galvanométriques non résonants, nous avons une perte de souplesse au niveau de :

- la forme du balayage qui est imposée par le couple de fréquence de résonance (f_{Rx} , f_{Ry}) du scanner ; seules deux formes de trajectoire de balayage sont alors possibles : spirale ($f_{Rx} = f_{Ry}$) ou Lissajous ($f_{Rx} \neq f_{Ry}$)
- la période du balayage qui est imposée par les fréquences de résonances ; il est impossible d'augmenter le temps d'exposition.

Les microscopes à balayage commerciaux font souvent appel à l'association d'un miroir résonant et d'un miroir galvanométrique. Ce type d'architecture résonante/non résonante est en fait également utilisé en endomicroscopie pour le balayage proximal d'un faisceau de fibres (Cellvizio, Mauna Kea Technologies). Dans le cas monofibre à balayage distal c'est également possible en associant deux céramiques de natures différentes [Brown 12, Ouzounov 13 b] (voir Chapitre 2). De façon prospective, on peut aussi imaginer un scanner hybride associant la résonance d'une fibre par actuation piézoélectrique sur un axe et la déformation galvanométrique d'un polymère électro-actif [Wang 05] pour le deuxième axe. Ce type de solution offrirait une plus grande souplesse et relâcherait au moins en partie les deux contraintes listées ci-dessus. Cette solution innovante n'a pas été testée dans la présente étude qui concerne donc un système doublement résonant à actuation piézoélectrique.

a. Choix de la figure de balayage

Comme cela a déjà été dit au chapitre 4 le balayage ligne / colonne permet un échantillonnage homogène du champ. Cependant, il nécessite une grande différence entre les deux fréquences des deux axes du mouvement. Le rapport des deux fréquences doit être égal au nombre de lignes souhaitées soit plusieurs centaines habituellement. Dans le cas d'un résonateur à fibre

doublement résonant, même en faisant des gros efforts pour dissymétriser fortement le résonateur [Helmchen 2013], un tel écart semble impossible à réaliser, qui plus est tout en conservant un facteur de qualité élevé. Le balayage Lissajous, qui nécessite lui aussi de dissymétriser volontairement le résonateur, induit le sur-échantillonnage de la périphérie de l'image. Or les informations importantes sont généralement au centre du champ observé. La solution la plus simple et à pas mal de points de vue la plus efficace est alors le balayage spiral.

b. Propriétés du balayage en spirale pour la formation d'une image

Une fois la trajectoire circulaire obtenue de façon maîtrisée, il faut effectuer une modulation en amplitude afin d'obtenir un balayage spiral partant du centre pour rejoindre la périphérie et couvrant un champ image en forme de disque (Figure 103).

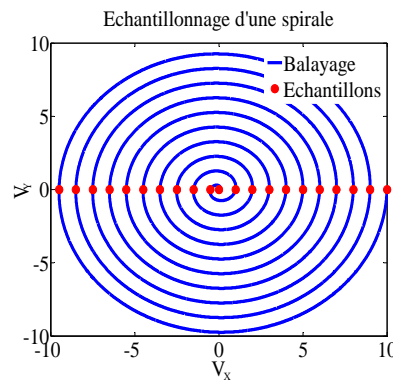


Figure 103 : Balayage spiral.

A titre d'exemple considérons dans un premier temps un balayage composé de seulement 10 spires (voir Figure 103). Si l'on se positionne sur l'axe horizontal, on peut voir qu'il est possible d'acquérir 20 échantillons le long de cet axe soit le double du nombre de spires. Dans le cas réel, nous souhaitons une image représentant l'équivalent d'une image carrée de 250×250 pixels soit 62500 pixels au total. Pour cela, il nous faut donc recourir à l'utilisation de 125 spires, chacune devant être échantillonnée 500 fois, ce qui donne bien $500 \times 125 = 62500$ pixels.

Afin d'obtenir une spirale sortante, nous modulons l'amplitude du signal sinusoïdal d'excitation par une rampe linéaire (Figure 104). La durée Δt de cette modulation est conditionnée par la fréquence de résonance ($f_r = 1416$ Hz) ainsi que par le nombre de spires ($N = 125$ spires) :

$$\Delta t = \frac{N}{fr} = \frac{125}{1416} \approx 88 \text{ ms}$$

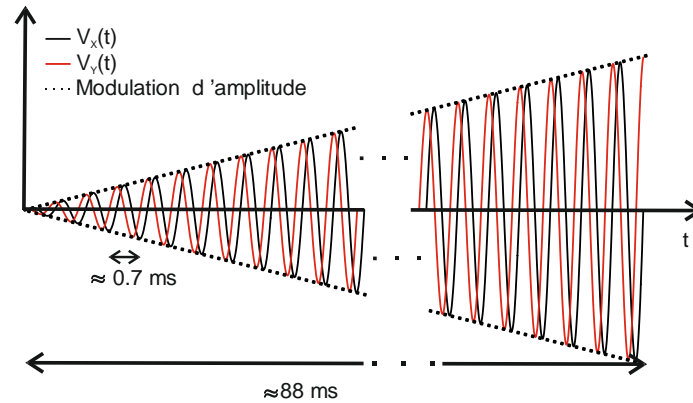


Figure 104 : Description simplifiée des commandes utilisées ; en noir : $X(t)$ en forme de cosinus ; en rouge : $Y(t)$ en forme de sinus.

La Figure 105 présente un résultat de simulation numérique du système réel excité selon un seul axe. On peut voir que l'excitation modulée linéairement (courbe rouge) n'est pas suivie correctement par la fibre optique (courbe bleue). Ce phénomène est lié au régime transitoire du système. Le facteur de qualité du résonateur vaut 236. La durée du régime transitoire est approximativement égale à Q fois la période d'oscillation (i.e. 0,7 ms) ce qui donne une durée de transitoire supérieure à 100 ms qui est donc plus long que la spirale. Cet effet de transitoire est donc inévitable.

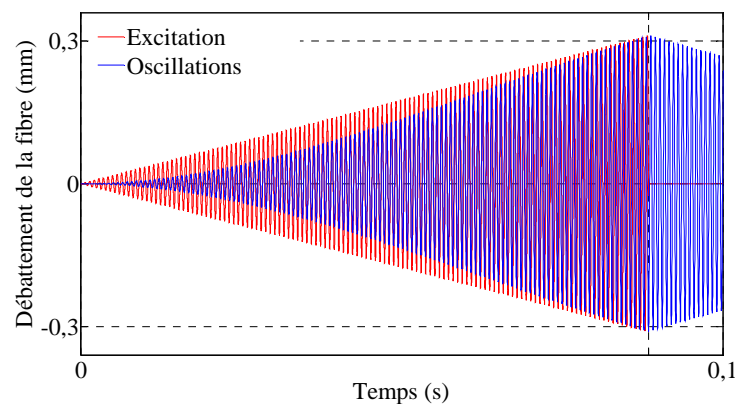


Figure 105 : Simulation numérique des oscillations de la fibre optique lors de l'excitation unidimensionnelle par un signal sinusoïdal à 1416 Hz modulé par une rampe linéaire d'environ 88 ms. Rouge : excitation ; Bleu : oscillation de la fibre optique.

Afin de vérifier ce comportement, j'ai réalisé la mesure expérimentale correspondant à la simulation précédente. Pour cela, j'ai utilisé un capteur de position bidimensionnel (en anglais : Position Sensor Detector, PSD) (C10443-04, Hamamatsu) afin de visualiser efficacement les oscillations en 2D de la fibre optique lors de la réalisation d'une spirale. La face de sortie

de la fibre optique est imagée sur le détecteur. Celui-ci fournit à chaque instant par l'intermédiaire de quatre tensions la position du barycentre du faisceau focalisé sur sa surface. A l'aide d'une carte d'acquisition (USB 6343, National Instruments) et du logiciel LabVIEW, les tensions sont acquises à 160 kHz (fréquence maximale de fonctionnement du PSD), permettant ainsi un suivi précis de la trajectoire de la fibre.

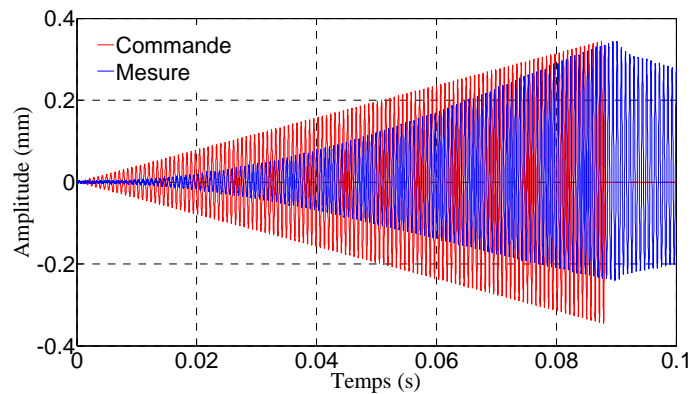


Figure 106 : Oscillations mesurées de la fibre optique lors de l'excitation par un signal sinusoïdal à 1416 Hz modulé par une rampe linéaire. Rouge : excitation ; Bleu : oscillations de la fibre optique mesurées avec le PSD.

On peut voir sur la Figure 106 que le comportement prévu en simulation est parfaitement retrouvé lors de l'expérience. La fibre ne suit pas fidèlement la commande. Nous verrons plus loin la solution simple qui a été retenue pour corriger au moins en partie ce problème.

La tension maximale à la fin de la rampe est de 30 V (crête à crête). A ce moment-là, l'amplitude maximale d'oscillation de la fibre optique est d'environ 600 μm . Avec l'effet de grandissement dû à l'optique qui fait suite à la fibre (grandissement d'environ 0.5) cela correspond à un champ d'observation de 300 μm .

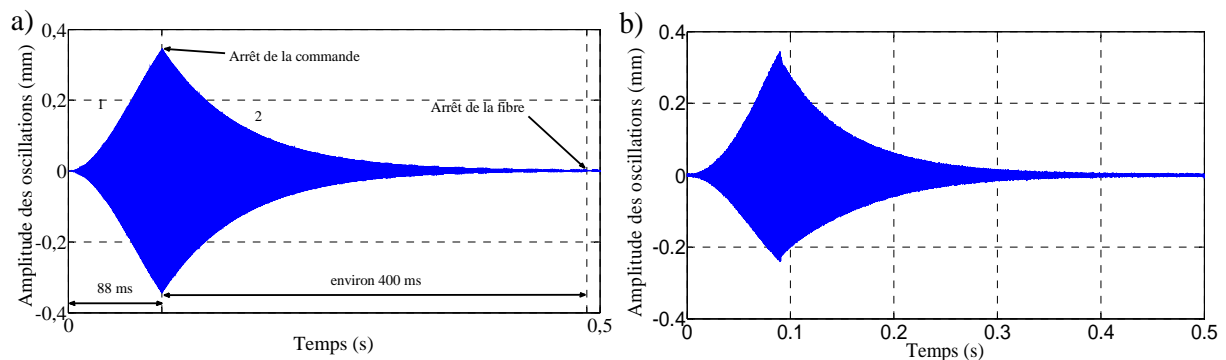
c. Acquisition d'une séquence d'images

i. Amortissement libre de la fibre

Lors de la réalisation du micro-scanner, la fixation de la fibre a fait l'objet d'une attention particulière. Afin de maximiser le facteur de qualité du résonateur, nous avons fait réaliser au tour d'horloger par Alain Dexet, qui est technicien à XLIM, des pièces d'adaptation sur mesures. Ces précautions nous permettent d'utiliser des tensions d'alimentation faibles de l'ordre de 30V (crête à crête). En contrepartie, on vient de voir que le résonateur présente un

important régime transitoire dans la phase motrice du scanner. Comme nous allons le voir ce n'est pas la seule conséquence de l'utilisation d'un facteur de qualité élevé.

Afin de réaliser une seconde image identique à la précédente, après la fin de la phase motrice du scanner (spirale sortante), il convient d'attendre le retour de la fibre sur l'axe en $X=0$ $Y=0$ avant d'imposer une deuxième spirale sortante strictement identique à la précédente. L'amortissement étant très faible, le temps nécessaire pour que la fibre s'arrête de ses propres moyens est de l'ordre de 400 ms, ce qui est très long au regard du temps alloué pour l'acquisition d'une image (Figure 107). Rappelons que le cahier des charges que nous nous sommes imposé est de 8 images par seconde, soit seulement 125 ms entre deux images. Le régime amorti libre serait donc une perte de temps importante, réduisant de manière considérable le nombre d'images par seconde, ceci largement en dessous de la valeur donnée par notre cahier des charges.



Dans cette configuration, il est possible d'obtenir au maximum 2 images par seconde. La Figure 108 présente les oscillations de la fibre lorsque l'on tente d'obtenir 8 images par seconde. Le centre du champ n'est jamais atteint car la fibre ne s'arrête jamais.

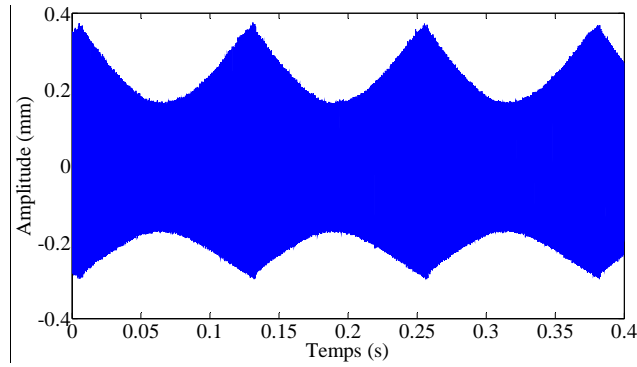


Figure 108 : Oscillations de la fibre à la cadence de 8 images par seconde dans une configuration faisant uniquement appel à l'amortissement libre de la fibre.

ii. Application d'un freinage pour la formation d'images successives

Afin d'augmenter le nombre d'image par seconde, la réduction du temps entre deux images est fondamentale. Pour cela, nous utilisons un balayage en trois temps [Engelbrecht 08, Kundrat 11, Lee 10, Seibel 06, Zhao 10]. Dans la première partie (phase 1 dans la Figure 109), la céramique piézoélectrique joue un rôle moteur. Elle entraine la fibre afin de réaliser une spirale sortante permettant l'acquisition de l'image. Puis, en déphasant le signal de commande de π , on transforme l'actuation produite par la céramique en frein actif dans le but de ramener la fibre au plus vite sur l'axe (phase 2 dans la Figure 109). Enfin dans un troisième temps, on arrête l'alimentation du piézoélectrique ce qui a pour effet d'imposer un régime librement amorti suffisamment long (quelques dizaines de millisecondes) permettant d'assurer l'arrêt complet de la fibre avant l'image suivante (phase 3 dans la Figure 109).

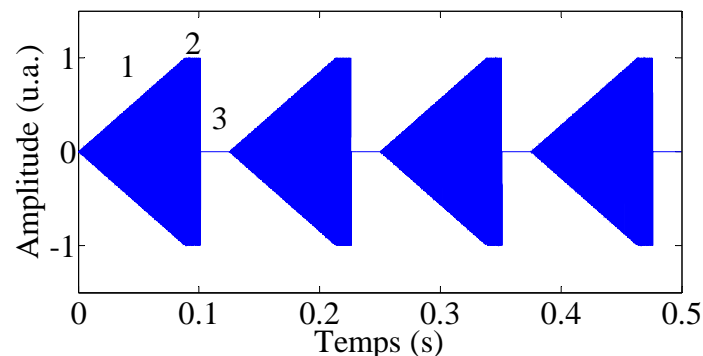


Figure 109 : Commande en trois temps appliquée à la céramique piézoélectrique, 1 : spirale sortante, acquisition de l'image ; 2 : freinage de la fibre ; 3 : repos.

Le réglage de la phase de freinage (instant de démarrage, phase, amplitude et durée) s'effectue de manière itérative. Tout d'abord on utilise une commande d'arrêt longue. Ceci

permet d'ajuster la phase du signal de freinage jusqu'à obtenir la Figure 110 a). Lorsque cette phase est ajustée alors le temps de retour de la fibre vers l'axe est minimal. Soit t_c l'instant où la fibre repasse par l'axe. Sur le cas de la Figure 110 a) la phase de freinage actif est trop longue. Elle se termine après t_c . Ainsi après t_c la force de freinage se transforme en une force motrice qui relance la fibre et l'écarte à nouveau de l'axe. Il est alors possible de réduire la durée de la commande d'arrêt afin d'obtenir la Figure 110 b) correspondant à un arrêt optimal. Ces étapes sont bien évidemment à réaliser sur les deux axes. Lors de ce réglage, le passage du régime forcé (spirale sortante) au freinage actif a nécessité un saut de phase d'environ 162° soit 2.83 rad. La fibre a pu être stoppée en 12 ms soit 17 oscillations.

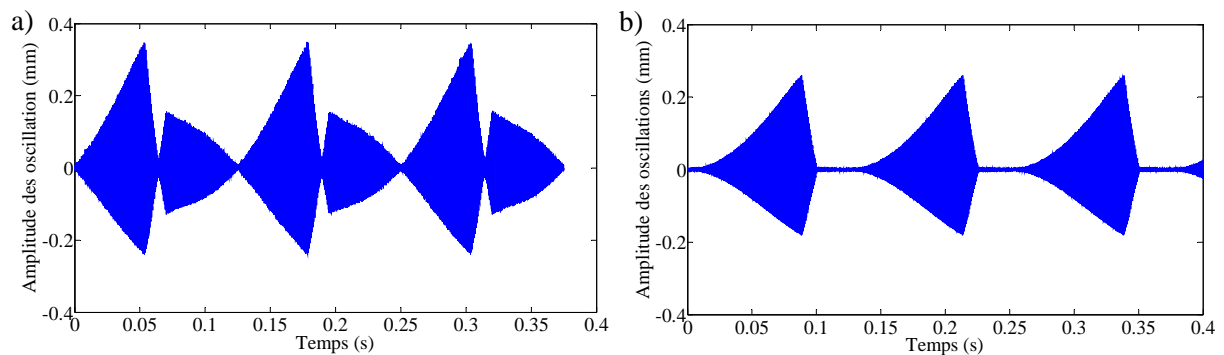


Figure 110 : Mesures des oscillations de la fibre optique à la cadence de 8 images par seconde ; a) freinage trop long ; b) freinage idéal.

II. Micro-optiques

Le micro-système optique qui doit être placé après la fibre optique est l'association d'un collimateur et d'un objectif (voir Chapitre 2 Figure 33). Le choix de ce système conditionne les caractéristiques optiques (ouverture numérique, résolution, champ de vue, distance de travail, chromatisme, aberrations géométriques) et aussi les performances énergétiques du système (efficacité d'excitation et de collection). Une attention particulière doit être portée sur le choix de cette optique.

Je rappelle le cahier des charges fixé pour ce composant :

- des dimensions réduites (diamètre et longueur) pour une bonne miniaturisation du dispositif.
- une ouverture numérique du côté de l'objectif importante afin de maximiser la résolution et l'efficacité de collection de la réponse.

- une distance de travail importante afin de réaliser des images en profondeur dans les tissus.
- une bonne transmission dans le visible et dans l'infrarouge afin de maximiser l'efficacité d'excitation et de collection.
- un faible chromatisme pour une meilleure collection de la réponse non-linéaire visible.
- des aberrations hors-axe faibles pour éviter les distorsions de l'image et permettre un champ d'observation important (de l'ordre de 250 μm).

1. Choix et simulation de la micro-optique

Au cours de ma thèse, j'ai réalisé le design d'un assemblage de micro-optiques achromatiques en m'inspirant de la publication [Zhao 10]. A l'aide du logiciel Zemax (Radiant Zemax), j'ai étudié différentes configurations se basant sur l'association de trois doublets achromatiques commerciaux différents (Edmund Optics (EO)), traités anti-reflet dans le visible, de 2 mm de diamètre externe, présentant des focales de 6 mm (ref. EO #65-569), 4 mm (ref. EO #65-568) ou 3 mm (ref. EO #65-567). Ces simulations ont abouti au système optique présenté à la Figure 111. Ce système permet un bon compromis entre la résolution, la taille du champ d'observation et la distance de travail. Il présente un grandissement théorique de 0,42 (mesuré 0,48), ainsi que des ouvertures numériques objet (côté fibre) de 0,19, et image (côté échantillon biologique) de 0,45. L'ON objet est alors comprise entre l'ON du cœur excitateur de la fibre (0,13 à 810 nm) et l'ON de la gaine collectrice (0,27 à 405 nm) de la fibre.

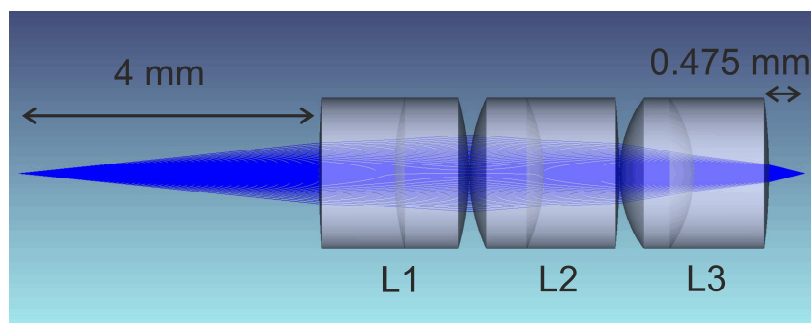


Figure 111 : Assemblage de trois doublets achromatiques commerciaux Edmund Optics (EO) ; L1 : ref. EO #65-569 ; L2 : ref. EO #65-568 ; L3 : ref. EO #65-567 (gauche : fibre optique ; droite : échantillon).

Ces simulations prévoient que l'association de cette optique et de la fibre T1628C fabriquée au PhLAM donne des résolutions latérale et axiale respectivement égales à 0.62 μm et

3.1 μm et un champ de vue supérieur à 300 μm . La distance de travail de cette optique vaut 475 μm .

2. Autre lentille commerciale possible

Afin de tester l'efficacité de la micro-optique précédente, nous avons réalisé un test comparatif avec une lentille grin commerciale optimisée pour l'imagerie multiphotonique (ref. GT-MO-080-0415-810 de chez GRINTECH) (Figure 112).

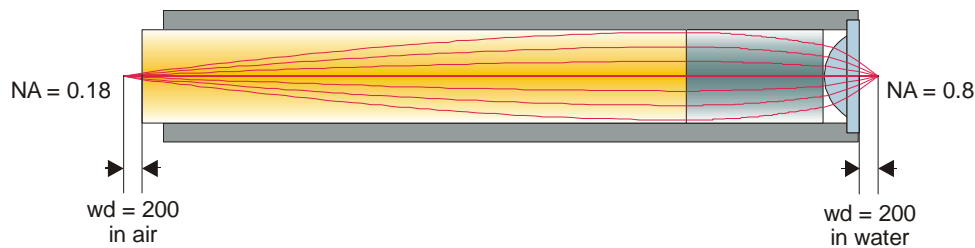


Figure 112 : Lentille grin GT-MO-080-0415-810 de chez GRINTECH. La fibre endoscopique se situe à gauche de la lentille.

Le Tableau 4 donne une comparaison entre cette lentille grin et le système achromatique décrit au paragraphe précédent. On peut voir que la lentille grin est meilleure au niveau ouverture numérique et dimensions. On peut donc s'attendre à une meilleure résolution et à une meilleure collection de la réponse non-linéaire, avec une miniaturisation potentiellement supérieure. Cependant, l'assemblage de doublets achromatiques présente la plus grande distance de travail ce qui permet d'imager en profondeur dans les tissus. En outre, le champ de vue est plus grand avec le système achromatique. Enfin ce dernier possède une meilleure transmission dans l'IR ce qui devrait permettre de réduire la puissance moyenne à acheminer et donc le risque d'effets non-linéaires dans la fibre.

Caractéristiques :	Assemblage de trois doublets achromatiques	Lentille grin (GT-MO-080-0415-810 de chez GRIN-TECH)
Dimensions	Diamètre : 2 mm Longueur : 6 mm	Diamètre : 1,4 mm Longueur : 7 mm
Grandissement	0,48 (mesuré)	0,22 (théorique)
Ouverture numérique	ON _{objet} = 0,19 ON _{image} = 0,45	ON _{objet} = 0,18 ON _{image} = 0,8
Distance de travail	Objet : 4 mm Image : 0,475 mm	Objet : 0,2 mm Image : 0,2 mm (dans l'eau)
Transmission à 810 nm	75 % (mesurée)	50 % (mesurée)

Tableau 4 : Récupitulatif des caractéristiques des micro-optiques comparées.

3. Etude expérimentale comparative

a. Résolution

Les mesures de résolution sont réalisées en utilisant la fibre T1628C associée au dispositif de balayage qui a été présenté au début de ce chapitre. Comme dans le chapitre 3, nous réalisons l'image d'une bille fluorescente de 0,1 μm de diamètre et nous déduisons la valeur de la PSF du profil de l'image de la bille.

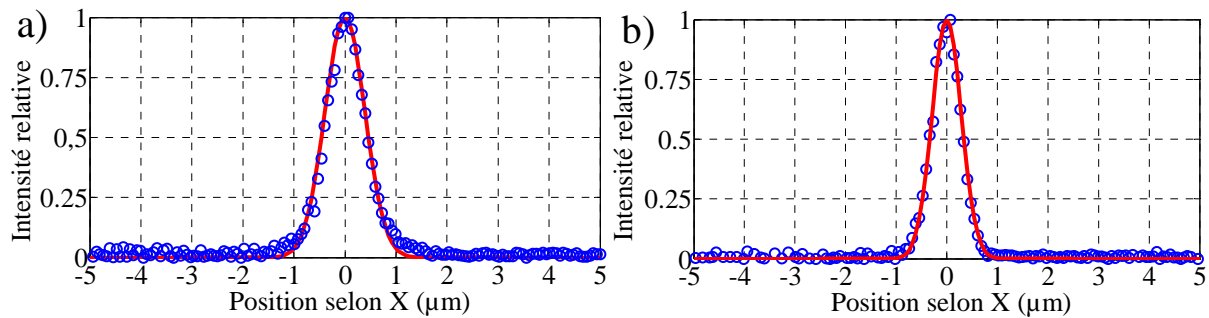


Figure 113 : Mesure de la résolution latérale en 2PEF de l'endomicroscope multiphotonique. Profil diamétral de l'image d'une bille fluorescente de 0.1 μm de diamètre. a) pour l'assemblage de doublets achromatiques : $\Delta x = 0,83 \mu\text{m}$; b) pour la lentille grin : $\Delta x = 0,67 \mu\text{m}$.

Au cours de ces mesures (Figure 113), nous avons obtenu une PSF de 0,83 μm pour l'assemblage de doublets achromatiques et de 0,67 μm pour la lentille grin. Comme attendu, la lentille grin permet une meilleure résolution grâce à son faible grandissement.

Comme précédemment, à l'aide des formules présentées dans la thèse de Delphine Débarre [Debarre 06], nous estimons la résolution axiale à partir de la résolution latérale. Nous obtenons alors après calcul une résolution axiale théorique de $5,5\text{ }\mu\text{m}$ pour les doublets achromatique et de $3,5\text{ }\mu\text{m}$ pour la lentille grin.

b. Champ de vue

La mesure de la taille du champ a eu lieu en faisant l'image en réflectance d'une mire métallique rectangulaire (R1L3S3P, Thorlabs). Comme on peut le voir sur la Figure 114, le dispositif de balayage présentait lors de ces acquisitions des distorsions, qui ont été éliminées par la suite. Ces distorsions qui sont localisées au centre ne perturbent pas la mesure de la taille du champ. On peut voir sur la Figure 114, que la taille de champ maximale autorisée par la lentille grin est de seulement $185\text{ }\mu\text{m}$. Au-delà le faisceau est en dehors de l'optique. Pour les doublets achromatiques, il est possible d'atteindre au moins $400\text{ }\mu\text{m}$ de champ de vue.

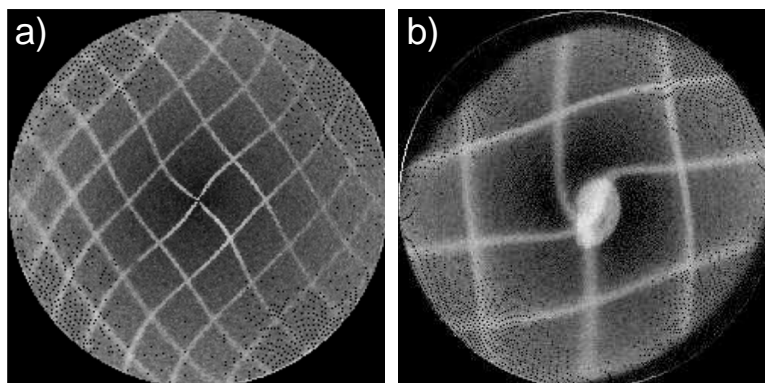


Figure 114 : Image en réflectance d'une grille calibrée de $50\text{ }\mu\text{m}$ de pas (R1L3S3P, Thorlabs). a) pour l'assemblage de doublets achromatiques : champ de vue = $400\text{ }\mu\text{m}$; b) pour la lentille grin : champ de vue = $185\text{ }\mu\text{m}$

c. Efficacité de collection

La collection de la réponse non-linéaire est essentielle afin de permettre de diminuer la puissance d'excitation utilisée ou bien afin de détecter des cibles endogènes peu brillantes. La Figure 114 présente le schéma du dispositif que j'ai utilisé pour mesurer l'efficacité de collection du système en fonction du type de micro-optique utilisée. Ce montage est identique à celui qui a été mis en œuvre pour comparer les fibres entre elles au Chapitre 3. Cette fois-ci seule la fibre T1628C est utilisée.

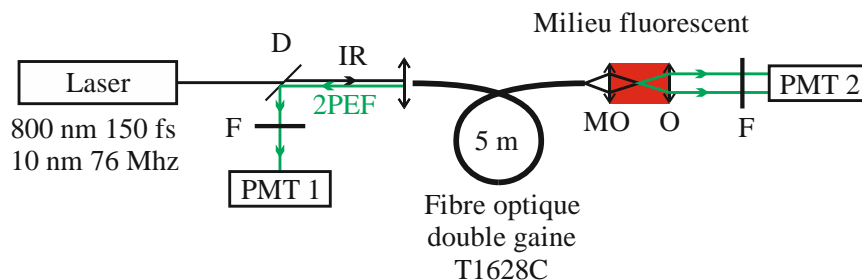


Figure 115 : Banc de mesure de l'efficacité de collection de l'endomicroscope ; F : filtre (FF01-720/SP-25, Semrock) ; D1 : miroir dichroïque (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; MO : Micro-optique (assemblage de doublets achromatiques ou lentille grin) ; O : objectif de microscope (UPLSAPO-60X, Olympus). Le module de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre n'est pas représenté sur cette figure.

Les courbes de la Figure 116 représentent l'évolution du signal collecté en fonction du signal généré pour les deux micro-optiques. Dans le cas d'un échantillon non diffusant (Figure 116 a), la lentille grin permet de collecter environ 4 fois plus de signal. Ce gain correspond approximativement au rapport des ouvertures numériques images élevées au carré ce qui semble cohérent. Cette mesure a été également faite en présence de diffusion.

Comme au Chapitre 3, nous avons utilisé un mélange de gel échographique, de fluorescéine et de lait donnant un libre parcours moyen mesuré égal à 100 microns ce qui simule de façon satisfaisante la matière biologique. Pour un échantillon diffusant (Figure 116 b) on constate que l'apport de la grin est encore plus notable puisqu'elle collecte 10 fois plus de signal.

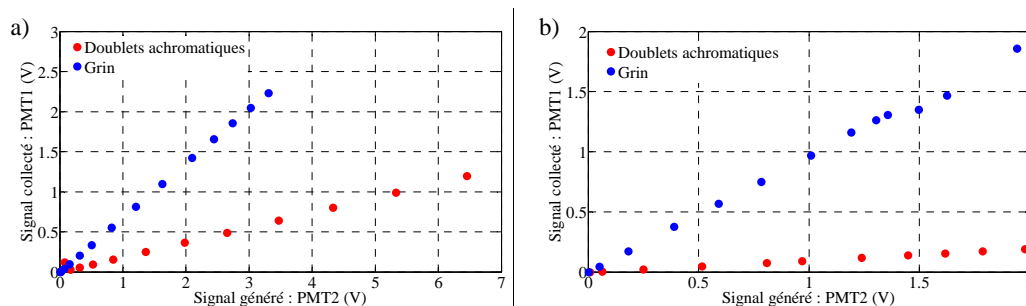


Figure 116 : Mesure de l'efficacité de collection des deux micro-optiques ; a) pour un milieu non diffusant ; b) pour un milieu diffusant ; rouge : pour l'assemblage de doublets achromatiques ; bleu : pour la lentille grin.

La lentille grin est donc meilleure du point de vue résolution et collection de la réponse non-linéaire. L'assemblage de doublets achromatiques donne quant à lui une distance de travail et un champ de vue plus importants. Il n'y a donc pas de solution polyvalente et les deux dispositifs ont chacun leur propre domaine d'application. L'étude qui sera présentée au Chapitre

6 correspond plutôt à une distance de travail et à un champ de vue importants de telle sorte que l'optique achromatique a été retenue pour la suite.

La configuration finale de la sonde étant définie, nous avons procédé à son assemblage à l'intérieur d'un tube en acier inoxydable super-écroui biocompatible conformément au plan de la Figure 117 :

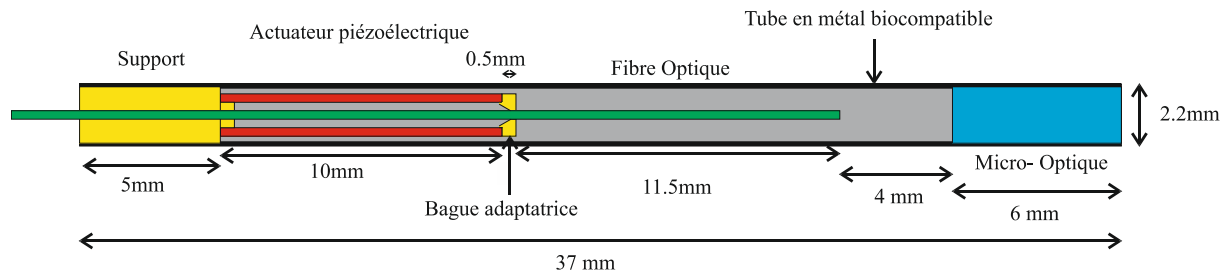


Figure 117 : Schéma de la sonde finale encapsulée. Micro-optique : association des trois doublets achromatiques Edmund Optics.

III. Construction de l'image

Ce paragraphe est relatif à la méthode utilisée pour construire l'image à partir du signal temporel (2PEF(t) ou SHG(t) selon le PMT considéré) délivré par le système lors du balayage d'une cible. Ce signal temporel mesuré par le PMT est transféré à l'ordinateur qui gère le système par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition (PCI 6115, National Instruments). Le logiciel Labview est utilisé pour tout le traitement du signal et pour la construction de l'image. Pour adresser la matrice image avec le signal temporel 2PEF(t) ou SHG(t), Labview a besoin de l'information sur la position du spot lumineux à chaque instant : $X_s(t)$ et $Y_s(t)$.

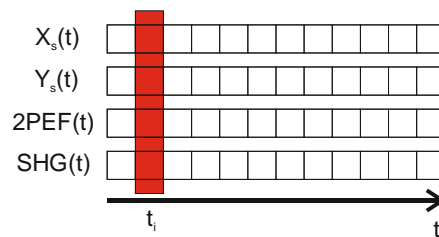


Figure 118 : Correspondance positions, signaux, instants.

En utilisant directement les signaux de commande $X(t)$ et $Y(t)$ comme signaux de position j'ai constaté l'apparition d'aberrations sphériques dans l'image. En effet, nous avons vu que la fibre ne suivait pas exactement le signal de commande qui est envoyé à l'actuateur du scanner. Cet écart vient de l'existence du régime transitoire du scanner à fibre qui vient lui-

même de la valeur élevée du facteur de qualité de ce dernier. Le détecteur de position (PSD) a montré que les oscillations de la fibre étaient modulées non pas par une rampe linéaire, comme c'est le cas de la commande, mais par une fonction croissante possédant une courbure tournée vers le haut (voir Figure 105). J'ai tenu compte de cet effet en synthétisant $X_s(t)$ et $Y_s(t)$ à partir de $X(t)$ et $Y(t)$ en ajoutant une sur-modulation non-linéaire constituée d'une portion d'arche de sinusoïde tournée vers le haut, d'amplitude et de période ajustables. J'ai défini ces deux paramètres préalablement par comparaison avec les signaux donnés par le PSD. J'ai ensuite affiné leurs valeurs lors de l'observation a posteriori de l'image délivrée par le système. Le résultat de cette correction est visible sur la Figure 120 du paragraphe suivant.

IV. Mesure des performances de l'endomicroscope multiphotonique

La Figure 119 présente le montage expérimental de l'endomicroscope multiphotonique.

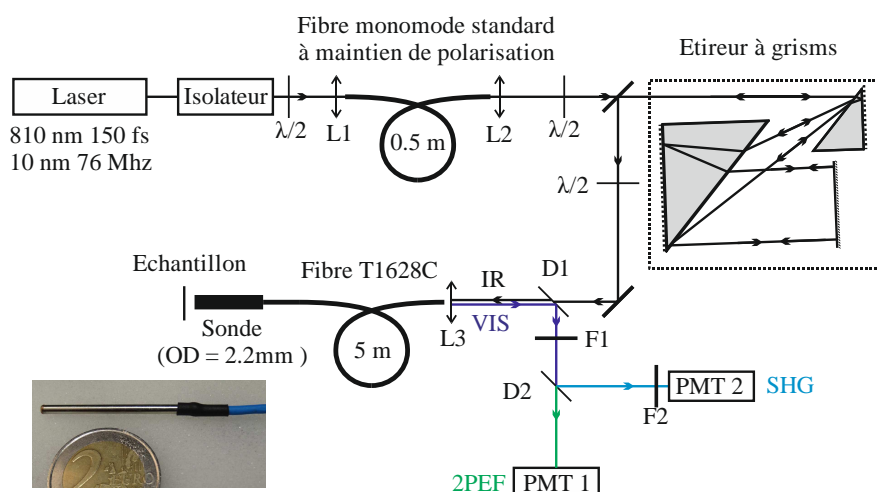


Figure 119 : Schéma expérimental de l'endomicroscope multiphotonique. $\lambda/2$: lame demi-onde ; Li : lentilles de collimation et de focalisation (L1 : A375TM-B, Thorlabs ; L2 : C110TME-B, Thorlabs ; L3 : C230TME-A, Thorlabs ; L4 : AL2520-A, Thorlabs) ; Di : miroirs dichroïques (D1 : FF705-Di01-25x36, Semrock ; D2 : Di02-R442-25x36, Semrock) ; Fi : filtres (F1 : FF01-720/SP-25, Semrock ; F2 : FF01-405/10-25, Semrock) ; PMT : Photomultiplicateur (H7422P-40, Hamamatsu) ; OD : diamètre extérieur.

Le système qui a été mis au point pour le microscope multiphotonique fibré (voir Chapitre 4) a été dupliqué. Ainsi on retrouve pour l'endomicroscope les mêmes éléments, à savoir la source laser (810 nm, 76 MHz, 150 fs), l'isolateur, la première fibre optique pré-compensatrice des effets non-linéaires, l'étireur à grisms pour la pré-compensation de dispersion, ainsi que la fibre endoscopique (T1628C) de 5 mètres de long. A l'extrémité distale de la fibre endoscopique se trouve la tête imageuse miniaturisée qui fait l'objet du début de ce chapitre. Cette

tête fait 2.2 mm de diamètre pour 37 mm de long et comprend le système de balayage basé sur la résonance d'un bras de fibre optique et l'assemblage de trois doublets achromatiques servant à réaliser l'image de la face de sortie de la fibre sur l'échantillon imagé. La sonde distale pèse 1.2 grammes. Le système de balayage est piloté par un ordinateur et par le logiciel LabVIEW à l'aide d'une carte de conversion numérique-analogique (ref. USB 6343 - National Instrument (NI)) générant 4 tensions de commande amplifiées par des amplificateurs E-835.00 (PI). Enfin une carte NI PCI 6115 acquiert les signaux venant des détecteurs. A chaque instant le faisceau laser excite un point de l'échantillon qui émet ou non une réponse. Celle-ci est collectée par la micro-optique puis par le cœur ainsi que la gaine collectrice de la fibre endoscopique dans le but d'être réacheminée vers le système de détection à l'aide du miroir dichroïque D1 qui réfléchit efficacement les longueurs d'onde inférieures à 690 nm. Sur cette voie de détection le filtre F1 (densité optique > 7 @ 800 nm ; $T > 95\%$ @ VIS) réjecte le reliquat d'infrarouge ayant été réfléchi par D1. Ensuite, le miroir dichroïque D2 définit deux canaux permettant de détecter séparément et simultanément le signal de SHG se situant dans la bande du filtre F2 (400 nm – 410 nm) et les signaux de 2PEF compris dans la bande 465 nm - 690 nm. La détection s'effectue à l'aide de deux photomultiplicateurs identiques (H7422P-40, Hamamatsu ; efficacité quantique maximale = 40% @ 550 nm). Tout le module de détection (mais aussi l'étireur) sont à l'intérieur d'une boîte opaque exempte de parasites dus à la lumière ambiante. En détection analogique, chaque PM est suivi d'un amplificateur trans-impédance bas bruit à gain et à bande passante réglable jusqu'à 500 kHz (ref. DLPCA-200 de chez Femto-Messtechnik GmbH). Les PMs fournissent des signaux temporels dont chaque instant correspond à une position sur l'échantillon. Ces signaux sont numérisés à l'aide d'une carte d'acquisition (PCI 6115, National Instruments). Puis grâce à au logiciel LabVIEW et à une table de correspondance, les deux images correspondantes aux deux canaux de détection sont construites numériquement. Une image bimodale formée de la juxtaposition numérique des deux modalités d'imagerie est enfin synthétisée.

1. Rappel des résolutions transverse Δx et axiale Δz

Pour rappel (voir Chapitre 3 : I. 4. a.), l'endomicroscope multiphotonique possède une résolution latérale et axiale respectivement de 0,83 μm (mesurée) et 5,5 μm (évaluée).

2. Distorsions

Cette étape a consisté à vérifier que le dispositif nous permettait d'obtenir une image fidèle de l'objet observé. Comme au cours de la caractérisation du microscope multiphotonique (voir Chapitre 4), nous avons procédé à l'observation d'objets de géométrie simple sur lesquels des déformations sont facilement identifiables. Nous avons choisi d'utiliser une mire rectangulaire métallique (R1L3S3P, Thorlabs). L'observation est effectuée en réflectance @ 810 nm et un seul détecteur est requis. Le dichroïque D1, qui est placé en proximal avant la fibre optique et qui sert à extraire la réponse non-linéaire visible provenant de l'échantillon, n'est pas parfaitement transparent à la longueur d'onde d'excitation. Il permet de réfléchir vers le détecteur une faible partie de la lumière infrarouge revenant de la fibre après réflexion sur la mire métallique. Le détecteur qui possède une sensibilité maximale à 550 nm (efficacité quantique $\approx 40\%$ @ 550 nm) garde une certaine sensibilité dans l'infrarouge (efficacité quantique $\approx 10^{-5}$ @ 800 nm) ; il est toutefois nécessaire pour cette expérience d'enlever le filtre F1 (voir Figure 66) servant à rejeter la longueur d'onde d'excitation.

La Figure 120 correspond à l'image en réflectance à 810 nm de la mire métallique. Le champ a un diamètre de 280 μm pour une tension d'alimentation crête à crête de 30 V. Les images ont été enregistrées à une cadence de 8 images par seconde. L'image a) est l'image obtenue sans correction de l'effet dû au régime transitoire du scanner. L'image b) a été acquise dans la configuration où l'on corrige la façon d'adresser la matrice image à l'aide des signaux de position modifiés $X_s(t)$ et $Y_s(t)$ (voir III précédent).

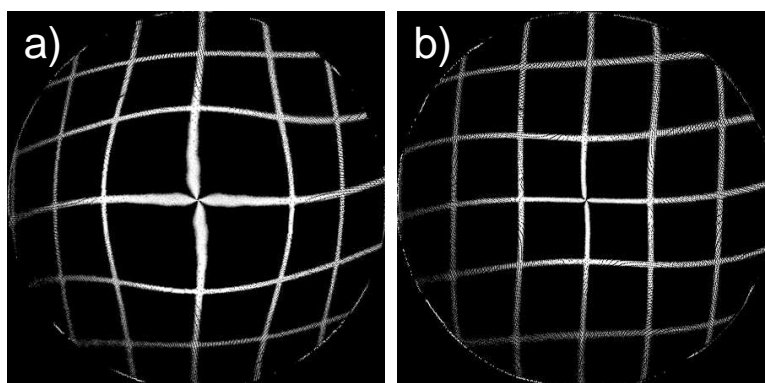


Figure 120 : Images en réflectance d'une grille métallique calibrée de pas égal à 50 μm (R1L3S3P, Thorlabs), acquises à 8 images par seconde ; a) image sans correction des problèmes lié au régime transitoire du scanner ; b) image après correction des distorsions.

V. Exemples d'images données par l'endomicroscope multiphotonique

Préambule : les exemples d'acquisitions qui sont présentés dans la suite de ce chapitre ont été obtenus à 810 nm au rythme de 8 image/s et avec 62500 pixels/image sans aucun marquage (comme toutes les images montrées dans ce manuscrit). Le balayage d'une image durant environ 88 ms, chaque pixel correspond à environ 1,4 μ s. Les images qui sont présentées correspondent aux mêmes échantillons qu'au chapitre 4. Les observations ont été réalisées en parallèle, et les échantillons biologiques n'ont subi aucune modification supplémentaire.

1. Images de tendon de queue de rat

Pour cette observation, seul le canal de la SHG est utilisé. La Figure 121 correspond à une étude de la réponse en génération de seconde harmonique détectée en fonction de la puissance moyenne d'excitation IR appliquée sur l'échantillon. Le numéro de chaque image correspond à la puissance déposée sur le tissu en milliwatt. À 1 mW, un début de réponse est détecté. Avec seulement 3 mW, on commence à distinguer les fibres.

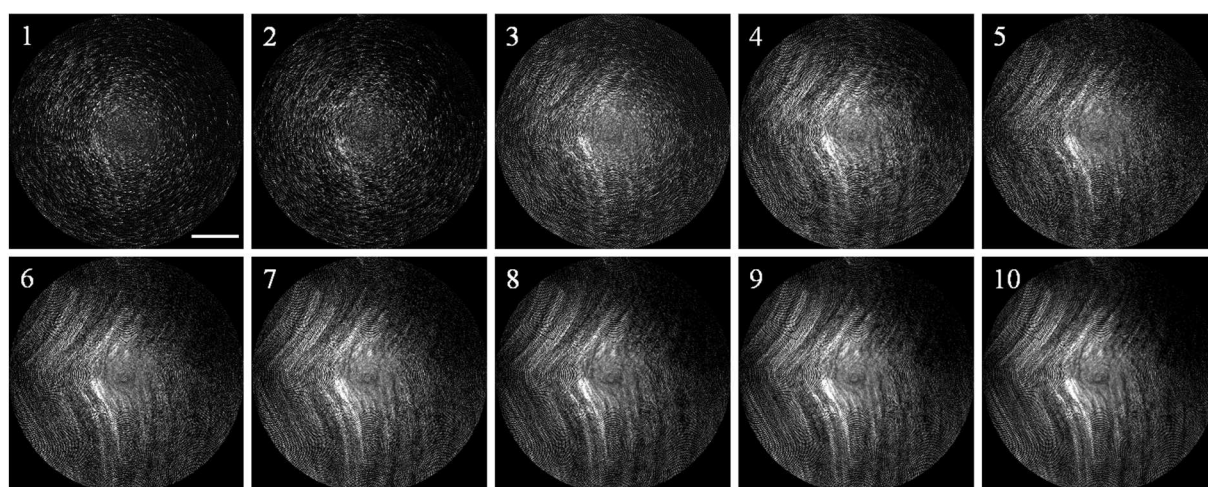


Figure 121 : Images SHG dans la bande 400 nm – 410 nm de tendons de queue de rat selon plusieurs puissances moyennes d'excitation allant de 1 à 10 mW. Barre d'échelle : 50 μ m.

La Figure 122 présente une vérification qualitative de la sensibilité en polarisation des fibres de collagène. Comme précédemment, on tourne la polarisation du faisceau exciteur à l'aide de la dernière lame $\lambda/2$ se situant en position proximale par rapport à la fibre endoscopique de façon à exciter l'un ou l'autre des modes propres à polarisation de la fibre (voir Figure 119). Il est ici aussi nécessaire d'ajuster légèrement l'étireur à grisms lors du passage d'un axe à l'autre, les deux axes ne possédant pas la même dispersion chromatique. La réponse en SHG

est maximale lorsque la polarisation incidente est colinéaire aux fibres de collagène et elle est minimale lorsque la polarisation est orthogonale aux fibrilles [Pena 06, Williams 05]. Comme pour le microscope multiphotonique fibré du chapitre 4, il est impossible d'analyser en position proximale la polarisation de la réponse SHG du fait du brouillage de polarisation introduit par la gaine très fortement multimode de la fibre optique.

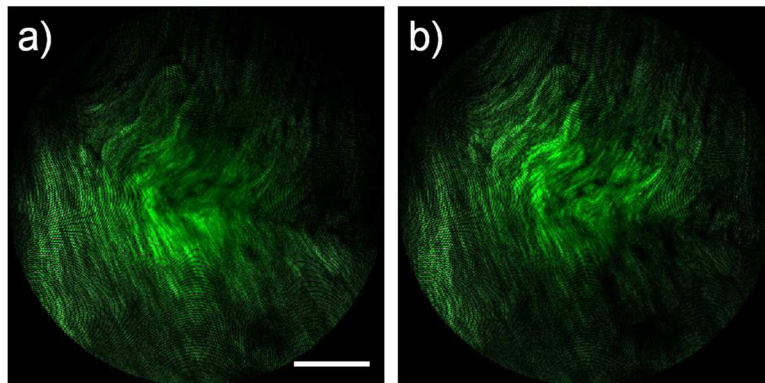


Figure 122 : Image SHG dans la bande 400 nm – 410 nm de tendons de queue de rat selon deux polarisations rectilignes incidentes orthogonales. Barre d'échelle : 50 μ m. Les directions de polarisation incidentes @ 810 nm sont approximativement les suivantes : gauche : ↘ ; droite : ↗

2. Images de tissu pulmonaire

La Figure 123 est une image de tissus pulmonaire humain sain. Comme auparavant avec le microscope multiphotonique fibré, la double modalité d'acquisition permet la discrimination des contributions venant du collagène (SHG : en vert sur l'image) et de l'élastine (2PEF : en rouge)

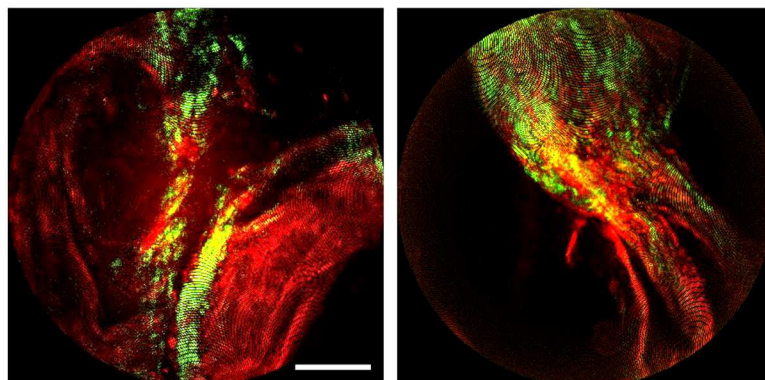


Figure 123 : Images de génération de seconde harmonique (vert) du collagène et de fluorescence à deux photons (rouge) de l'élastine d'un tissu pulmonaire humain sain. Barre d'échelle : 50 μ m.

3. Imagerie tridimensionnelle en profondeur

Comme cela a été écrit plusieurs fois dans ce manuscrit, un des points forts de la microscopie multiphotonique est la possibilité d'effectuer des acquisitions en profondeur dans les tissus afin d'obtenir une représentation en trois dimensions de ceux-ci. Afin de profiter de façon optimale de cette propriété fondamentale, nous avons volontairement choisi une micro-optique ayant une distance de travail importante. Afin de mettre en pratique cela, des acquisitions d'une même zone à plusieurs profondeurs ont été effectuées. La gestion de la profondeur d'observation est réalisée par une platine NanoMax commandée par des micromoteurs (MAX343/M, Thorlabs). La Figure 124 présente des acquisitions à différentes profondeurs. Le dispositif nous a permis d'obtenir des images jusqu'à 300 μm sous la surface de l'échantillon pulmonaire. Au-delà de cette profondeur, le signal devient très faible et nécessite des temps d'exposition plus importants. Comme lors des essais avec le microscope multiphotonique, une recherche d'optimisation de l'étireur selon la profondeur atteinte n'a apporté aucune augmentation du signal. Dans cette expérience la polarisation est rectiligne et la puissance sur les tissus est maximale (i.e. 30 mW). La dernière image de la figure correspond à la représentation sur trois dimensions de la zone observée.

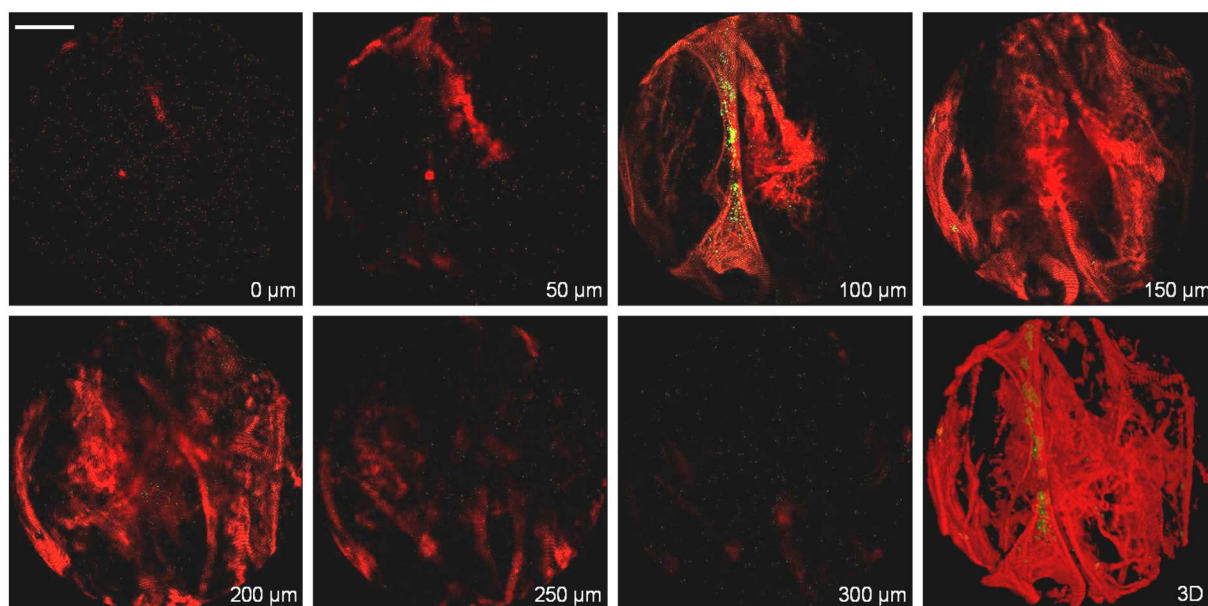


Figure 124 : Image de génération de seconde harmonique et de fluorescence à deux photons de tissu pulmonaire sain épais non marqué ; Rouge : réponse en 2PEF (élastine) ; Vert : réponse en SHG (collagène) ; barre d'échelle : 50 μm ; 62500 pixels/image ; 8 image/s et 1,4 μs /pixel. En bas à droite : image en perspective en 3D issue de la compilation d'un grand nombre de sections optiques entre $z = 0$ et $z = 300$ μm donnée par le logiciel ImageJ.

Il est également proposé de visionner une vidéo constituée d'une suite de sections optiques conformes aux précédentes, prises tous les $\delta z = 1 \mu\text{m}$ cette fois-ci, en allant à l'adresse internet suivante :

Lien : <http://mediacenter.unilim.fr/videos/?video=MEDIA140722121826715>

Résumé chapitre 5

Le chapitre 5 concerne la mise au point de l'endomicroscope multiphotonique qui est l'objectif principal de cette thèse. L'architecture de l'appareil est identique à celle du microscope fibré présenté au chapitre précédent. Le module de précompensation linéaire et non-linéaire est présent de même que la fibre à double gaine microstructurée air-silice à petit cœur fabriquée par le laboratoire PhLAM.

La principale spécificité de l'endomicroscope par rapport au microscope vient du micro-scanner qui a été spécialement développé pour cette application. Ce dispositif miniature de balayage laser est basé sur la résonance mécanique en 2D du bras de fibre optique laissé libre à l'extrémité distale de cette dernière sous l'effet de l'excitation produite par une céramique piézoélectrique tubulaire de petite dimension. Une attention toute particulière a été accordée à la maîtrise de ce micro-système et à la correction des aberrations inhérentes à son principe de fonctionnement. La sonde imageuse miniature qui a été réalisée est également munie d'une micro-optique dédiée sur mesure. Le diamètre extérieur de l'endomicroscope est de 2,2 mm pour une longueur rigide de la sonde de 37 mm.

Ce dispositif a permis l'enregistrement d'images bimodales de 2PEF et de SHG de 62500 pixels à la cadence de 8 images/seconde. Il présente une résolution latérale de 0.83 μm et délivre une taille de champ de vue maximale de 400 x 400 μm^2 . Cet endomicroscope multiphotonique a permis l'acquisition d'images de divers échantillons biologiques non marqués, *ex vivo* dans un premier temps, tels que des tendons de queue de rat ou des tissus pulmonaires humain. Ces images ont été obtenues avec moins de 30 mW sur les tissus et des temps d'exposition de seulement 1.4 μs par pixels. Enfin nous avons pu réaliser des images en profondeur en trois dimensions jusqu'à 300 μm sous la surface des tissus.

Chapitre 6 : Endomicroscopie multiphotonique *in vivo* de tissus vivants non marqués

Les performances de l'endomicroscope multiphotonique qui a été présenté au chapitre précédent ont pour l'instant été démontrées *ex-vivo* sur des coupes tissulaires. Nous passons maintenant à la validation de cet appareil *in vivo* sur animal vivant anesthésié. Ce travail s'inscrit dans le cadre de plusieurs projets de recherche (*) dont notamment Invisimmune qui est soutenu par la région Limousin (programme thématique ; 2013-2014). Ce projet porte sur l'étude de maladies de dépôt comme l'amylose ou la fibrose qui est le sujet de ce chapitre. La fibrose est liée à un dépôt anormal de fibres de collagène dans des organes comme le rein. La microscopie multiphotonique de génération de seconde harmonique du collagène est donc tout indiquée pour le dépistage de ce type de pathologie.

Les résultats qui vont être présentés dans ce chapitre sont le fruit de la collaboration avec les chercheurs suivants : Anne Druilhe qui est chargée de recherche à l'Inserm dans le laboratoire CRIBL (Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations ; UMR CNRS 7276) de l'Université de Limoges, Renaud Batrin qui était alors stagiaire en deuxième année de master professionnel dans l'équipe de Anne Druilhe, Tigran Mansuryan qui était alors chercheur contractuel à XLIM, Pierre Leclerc qui était alors stagiaire en deuxième année de master recherche à XLIM et Marc Fabert qui est ingénieur de recherche à XLIM.

(*) : les autres projets de recherche en cours au moment de cette thèse ayant un lien avec ce qui va être présenté dans ce chapitre et avec l'ensemble de la thèse sont : le projet Electro-biophotonique (programme thématique soutenu par la région Limousin ; 2013-2014), le projet FIMSTO (programme Physicancer soutenu par l'Inserm ; 2013-2014) et le projet IMUCEL (programme DEFI Instrumentation aux limites soutenu par le CNRS ; 2014).

I. Protocole biomédical

Les expériences sur animal vivant anesthésié qui vont être présentées dans ce chapitre ont été réalisées par le personnel de l'UMR CNRS 7276 dans le respect de la réglementation européenne, appliquée en France selon le décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Au cours de nos essais, nous avons observé des reins de souris sur lesquels la fibrose avait été induite par microchirurgie. Les partenaires biologistes ont réalisé une obturation de l'uretère d'un des deux reins des souris. De l'urine est alors stockée dans le rein opéré ce qui a pour conséquence le développement d'une fibrose collagénique dans le rein opéré comme nous allons le voir. Ce protocole a été validé par le service d'anatomopathologie du CHU de Limoges qui a confirmé le développement de la fibrose dans les reins opérés.

II. Tests préliminaires ex-vivo et comparaisons avec des tissus marqués

Les images qui sont présentées dans ce paragraphe ont été faites sur des coupes d'épaisseur égale à 5 μm . Les acquisitions provenant du microscope multiphotonique fibré ont été obtenues à 810 nm, à la cadence de 1 image par seconde, avec une résolution de 500 x 500 pixels et une puissance moyenne IR de 5mW sur les tissus. Pour l'endomicroscope, les acquisitions sont faites à 810 nm, au rythme de 8 images par seconde, avec une résolution de 62500 pixels et une puissance moyenne IR de 5 mW sur les tissus.

Dans le cas de tendons de queue de rat comme au chapitre précédent, les fibres de collagène sont denses et organisées. Il est alors relativement facile d'obtenir une réponse en génération de seconde harmonique. Pour la fibrose au contraire, le développement des fibres de collagène est désorganisé spatialement et celles-ci sont peu denses notamment lorsque le stade d'avancement de la pathologie est précoce. Il est alors plus difficile de capter une réponse en SHG. L'observation de ce type de collagène en SHG constitue alors un très bon test d'efficacité pour les deux instruments innovants qui ont été développés durant cette thèse.

Afin de valider la présence collagène, notamment celui dû à une fibrose rénale, les coupes ont été colorées avec des marqueurs du collagène. Ensuite elles ont été observées en plein champ avec le microscope inversé Olympus IX71 en lumière blanche en transmittance, et dans certains cas en lumière polarisée. Les marqueurs collagéniques utilisés sont les suivants :

- le Trichrome de Masson faisant ressortir le collagène en bleu-vert.
- le Rouge Sirius (ou encore Picrosirius Red). Ce marqueur augmente la biréfringence des zones collagéniques. En lumière blanche non polarisée, le collagène

apparaît en rouge. En microscopie en lumière polarisée avec le microscope inversé Olympus IX71, le collagène de type I ressort en jaune-orangé intense sur fond noir.

1. Imagerie multiphotonique de coupes de rein fixé et comparaison avec un marquage au Trichrome de Masson :

Dans un rein fibrosé, il existe deux types d'endroit où l'on est susceptible de trouver du collagène. On peut trouver du collagène dû à la fibrose en densité faible et variable dans tout le rein entre les tubules du rein. Que cela soit pour un rein fibrosé ou pour un rein sain, de fortes densités de fibres de collagène sont également présentes en périphérie des artères irriguant le rein. Dans ce cas le collagène joue son rôle de protéine structurelle. Elle donne sa rigidité à l'artère. La Figure 125 montre justement une artère rénale marquée au trichrome de Masson. En lumière blanche non polarisée (Figure 125 a) le collagène ressort en bleu-vert sur fond brillant. Il se situe effectivement à la périphérie de l'artère. L'image de la Figure 125 b) a été faite entre polariseur et analyseur croisés. Le collagène qui est biréfringent apparaît en rose-violet sur fond noir. On peut également noter à l'intérieur de l'artère la présence de nombreux petits ronds rouges correspondant à des globules rouges.

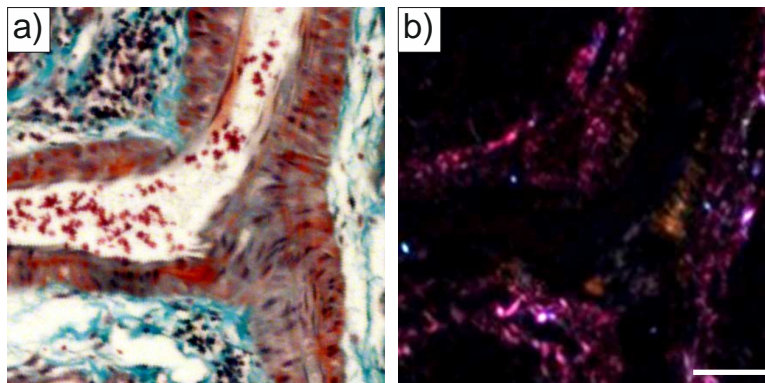


Figure 125 : Image en transmittance d'une artère marquée au trichrome de Masson réalisée avec le microscope inversé Olympus IX71 ; a) en lumière blanche en bleu-vert les fibres de collagène ; b) en lumière blanche polarisée en rose-violet les fibres de collagène biréfringentes ; barre d'échelle : 50 μm .

La Figure 126 correspond à la même zone de la même artère qui a été imagée à l'aide du microscope multiphotonique fibré du Chapitre 4. On détecte nettement sur la Figure 126 b) la réponse en SHG du collagène. Nous retrouvons également sur la Figure 126 a) les globules rouges grâce très vraisemblablement à une réponse endogène en 2PEF et non grâce au marquage. En effet les hématies sont connues pour être fluorescentes dans le cas de tissus fixés.

Nous avons obtenu le même type d'image de globules rouges sur des tissus d'aorte non marqués (voir Figure A8 c)).

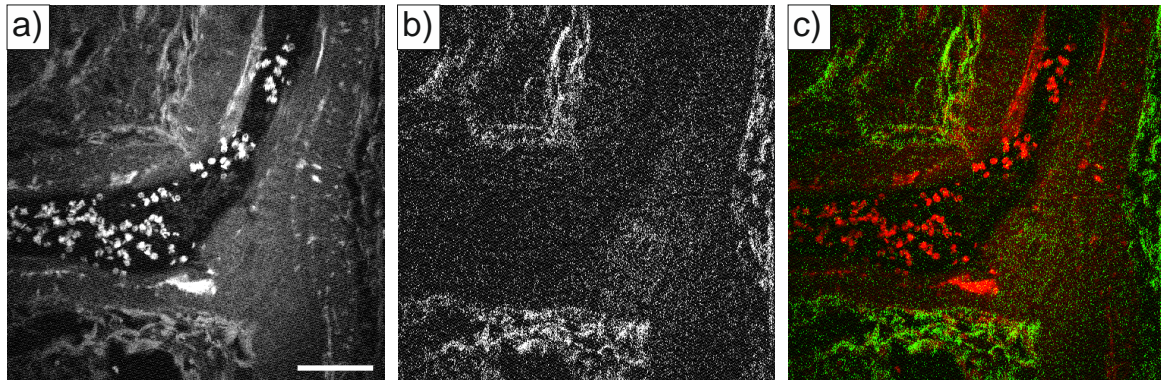


Figure 126 : Image d'une artère rénale fixée donnée par le microscope multiphotonique fibré du Chapitre 4 ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.

La Figure 127 correspond à un moyennage de 4 images donnant un meilleur rapport signal à bruit.

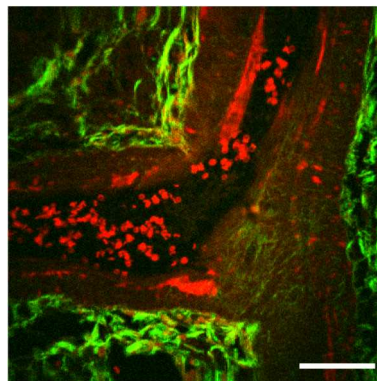


Figure 127 : Image moyennée sur 4 acquisitions d'une artère rénale fixée donnée par le microscope multiphotonique fibré du Chapitre 4; rouge : réponse en fluorescence à deux photons ; vert : en génération de seconde harmonique ; barre d'échelle : 50 μ m.

La Figure 128 présente l'image de la même zone de l'artère donnée par l'endomicroscope multiphotonique. L'image présente en son centre des déformations qui ont été corrigées par la suite (voir discussions Chapitre 5 paragraphes I et IV). Nous arrivons ici aussi à distinguer la réponse des fibres de collagène, ceci malgré une puissance d'excitation très faible, égale à 5 mW.

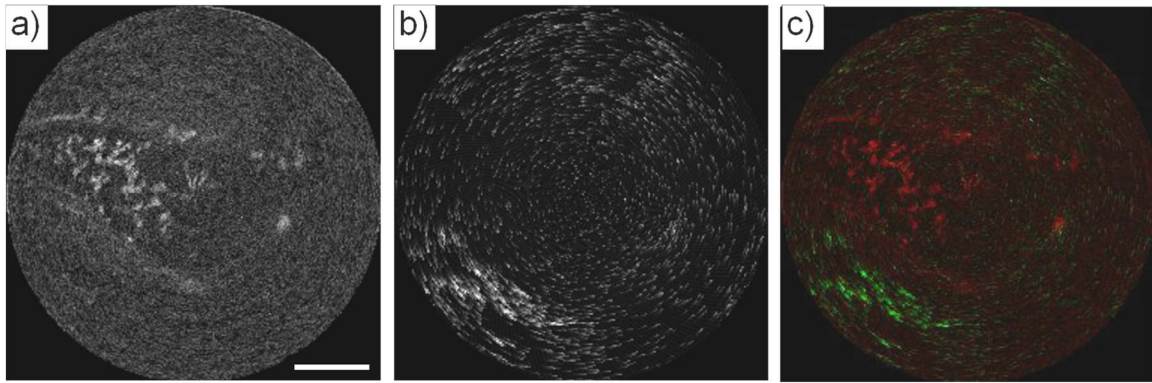


Figure 128 : Image d'une artère rénale donnée par l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

La Figure 129 présente une image issue de la moyenne de 4 acquisitions ce qui correspond alors à une cadence de prise de vue de 2 images/seconde.

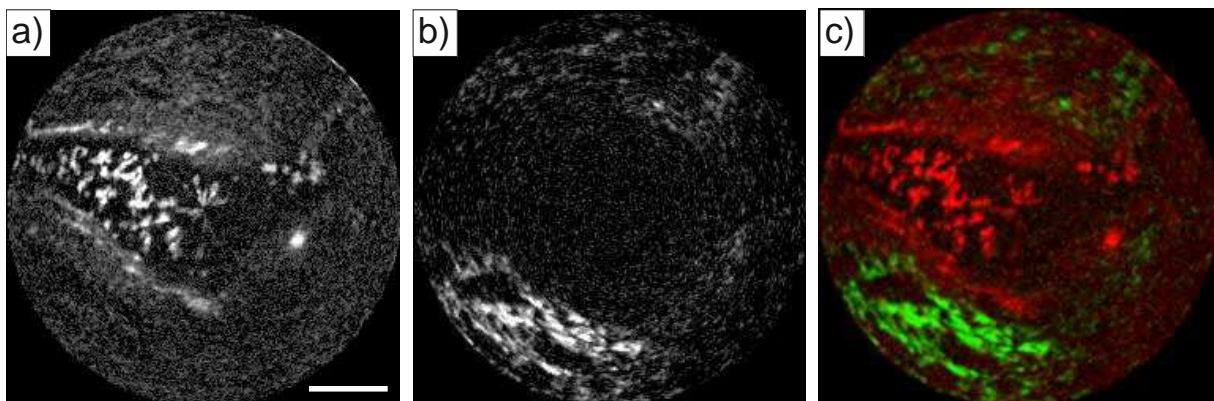


Figure 129 : Image moyennée sur 4 acquisitions d'une artère rénale réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

2. Imagerie multiphotonique de coupes de rein fixée et comparaison avec un marquage au Rouge Sirius

Nous avons également observé des échantillons de rein marqués avec du Rouge Sirius. La Figure 130 b) montre des zones collagéniques fortement biréfringentes jaune-orangées en lumière polarisée avec le microscope Olympus commercial.

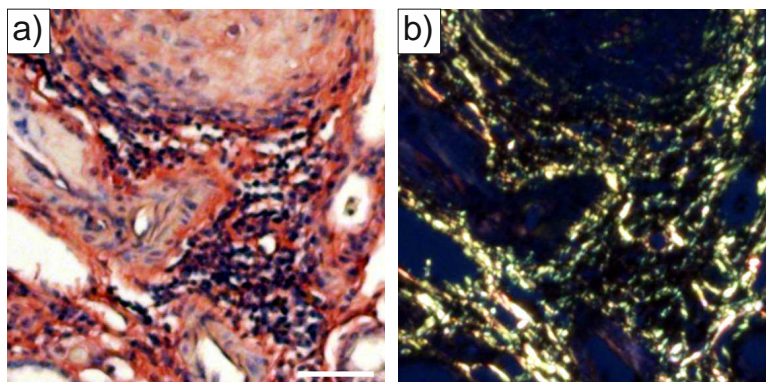


Figure 130 : Image de rein fibrosé marqué au Rouge Sirius réalisée avec le microscope Olympus IX71 ; a) en lumière blanche ; rouge foncé = collagène ; b) en lumière blanche polarisée ; jaune-orangée = zone biréfringente (fibres de collagène) ; barre d'échelle : 50 μ m.

La Figure 131 présente la même coupe exactement au même endroit observée en 2PEF et SHG avec le microscope fibré. On retrouve bien sur le canal SHG les différents éléments identifiés avec le Rouge Sirius. Le microscope multiphotonique fibré est donc suffisamment performant pour détecter de faible réponse en génération de seconde harmonique a priori sans marquage.

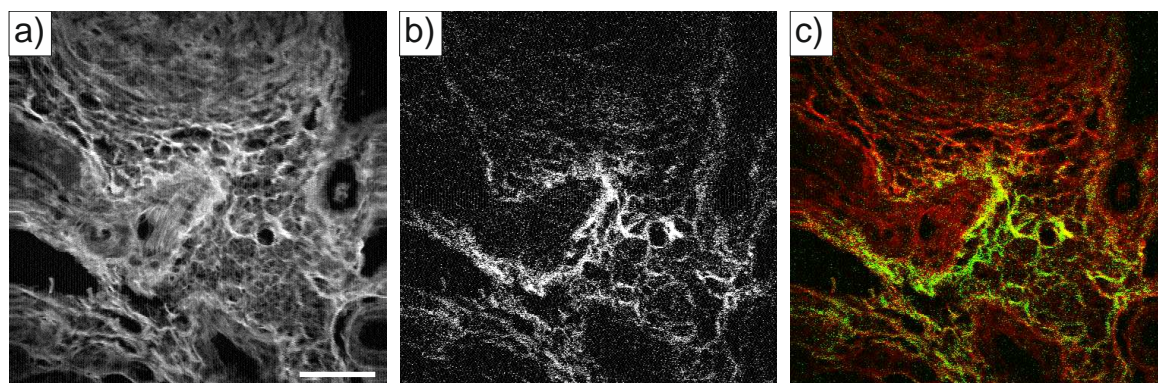


Figure 131 : Image d'un tissu rénal avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.

La Figure 132 montre l'image de la même coupe exactement au même endroit donnée par l'endomicroscope multiphotonique avec 5 mW sur le tissu.

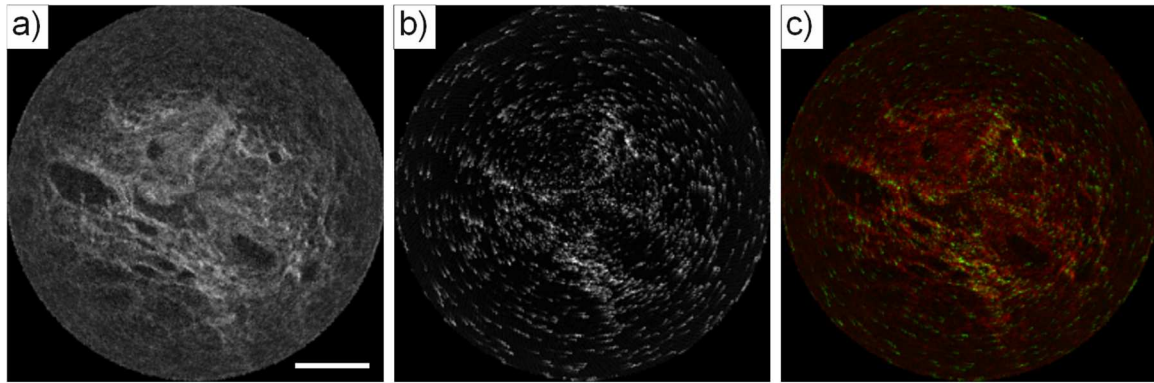


Figure 132 : Image d'un tissu du rein avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

La Figure 133 présente une image issue de la moyenne de 4 acquisitions ce qui correspond alors à une cadence de prise de vue de 2 images/seconde.

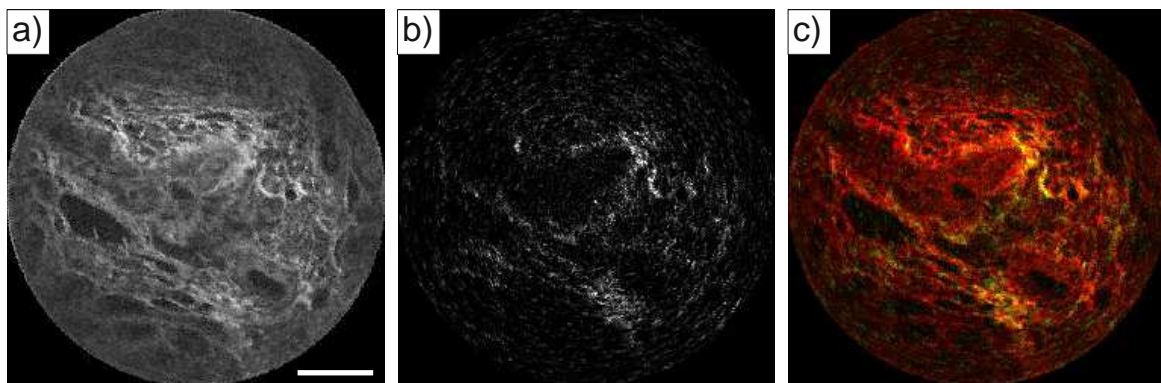


Figure 133 : Image moyennée sur 4 acquisitions d'un tissu du rein avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

Les exemples qui viennent d'être donnés dans ce paragraphe II concernent du collagène non pathologique se trouvant à la périphérie d'une artère ou d'un vaisseau sanguin. La figure suivante montre un dernier exemple particulièrement marquant de ce type de collagène structuré (Figure 134).

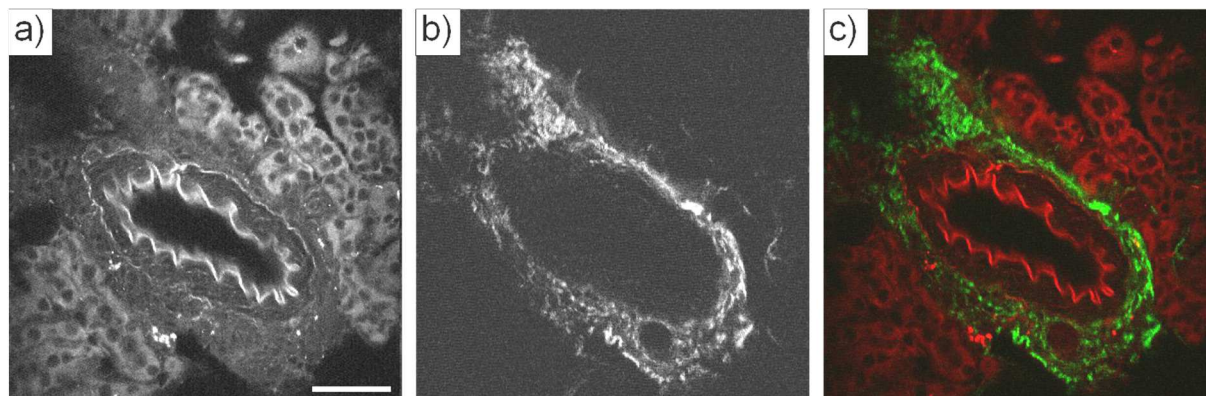


Figure 134 : Image d'une artère d'un rein de souris non marqué avec le microscope multiphotonique fibré. On reconnaît très nettement l'artère au centre de l'image. L'artère est entourée de collagène (en vert sur l'image de droite) qui lui donne sa rigidité. En haut à droite on voit également des tubules rénaux.

Nous passons maintenant à des cas concernant exclusivement du collagène dû à de la fibrose et à des tissus non marqués. L'objectif est cette fois de détecter du collagène interstitiel se trouvant entre les tubules du rein (voir en haut à droite sur la Figure 134 en 2PEF).

III. Observation de la fibrose rénale ex vivo

Dans ce paragraphe les acquisitions provenant du microscope multiphotonique fibré ont été obtenues à 810 nm au rythme de 1 image par seconde, avec une résolution de 500 x 500 pixels et une puissance moyenne IR de 10 mW sur les tissus. Pour l'endomicroscope, les acquisitions ont été faites à 810 nm au rythme de 8 images par seconde, avec 62500 pixels et une puissance moyenne IR de 10 mW sur les tissus. Les coupes ne sont pas marquées.

1. Observation des différents stades de développement de la maladie avec le microscope multiphotonique fibré

La Figure 135 montre l'image d'une coupe de rein sain donnée par le microscope multiphotonique fibré. Aucune réponse en SHG n'est détectée. Ceci correspond au résultat attendu (i.e. pas de collagène interstitiel dans un rein sain). Les tubules du rein sont parfaitement identifiables en 2PEF ainsi que leurs noyaux cellulaires (voir entouré 1 sur la Figure 135 c). La fluorescence qui révèle les tubules est vraisemblablement celle des flavines qui se trouvent dans ces cellules épithéliales.

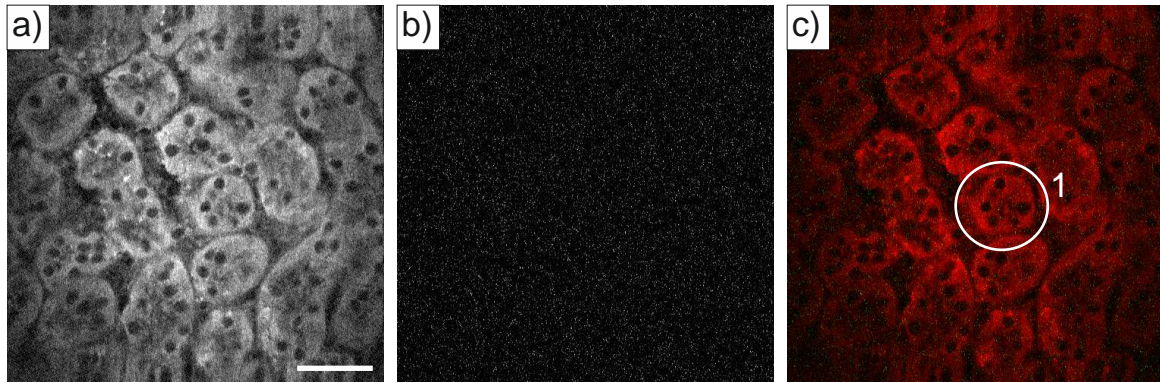


Figure 135 : Image d'un rein sain avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; 1 : section d'un tubule comportant 5 noyaux cellulaires parfaitement identifiables; barre d'échelle : 50 μm .

La Figure 136 donne l'image d'un rein malade. L'image est prise 6 jours après l'opération de microchirurgie qui induit la fibrose. On peut voir sur les images en SHG la présence de collagène interstitiel entre les tubules. Cela correspond au développement de la fibrose. Des images prises 13 jours après l'induction de la maladie donnent un résultat comparable, avec plus de collagène et une déstructuration encore plus visible des tubules.

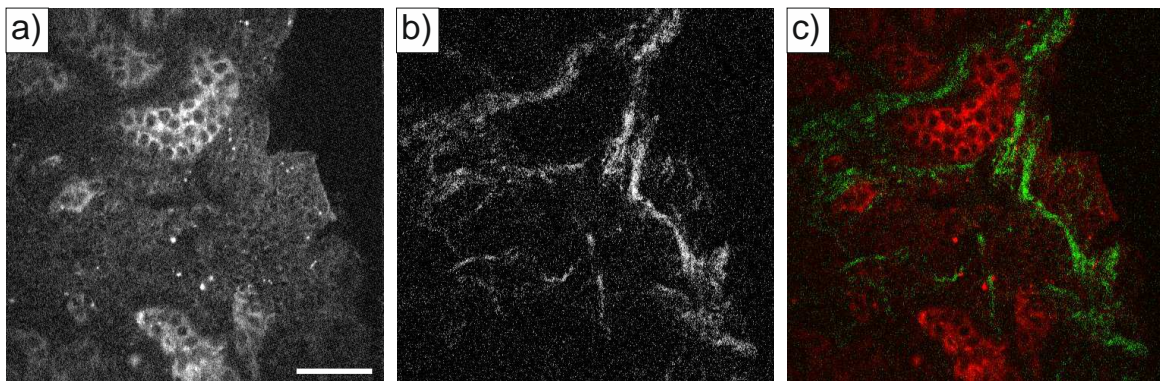


Figure 136 : Image d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

La Figure 137 montre l'image d'un rein malade à 21 jours après l'opération de microchirurgie. Il y a une très forte densité de fibres de collagène. L'organisation des tubules qu'on reconnaît à peine a disparu.

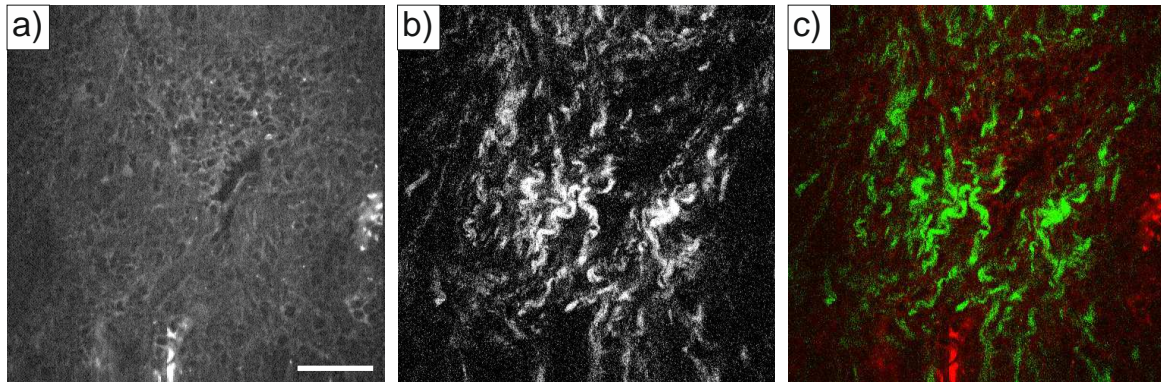


Figure 137 : Image d'un rein fibrosé à 21 jours avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

Nous venons de vérifier que le microscope multiphotonique fibré permettait de détecter la présence de fibrose rénale à un stade relativement précoce. Nous passons maintenant à des observations *ex-vivo* avec l'endomicroscope, de façon préparatoire à l'expérience finale qui se déroulera *in vivo*.

2. Observation avec l'endomicroscope multiphotonique

La Figure 138 concerne une fibrose à 6 jours. Le collagène interstitiel est clairement visible en génération de seconde harmonique ce qui démontre l'efficacité de l'endoscope multiphotonique en *ex-vivo*.

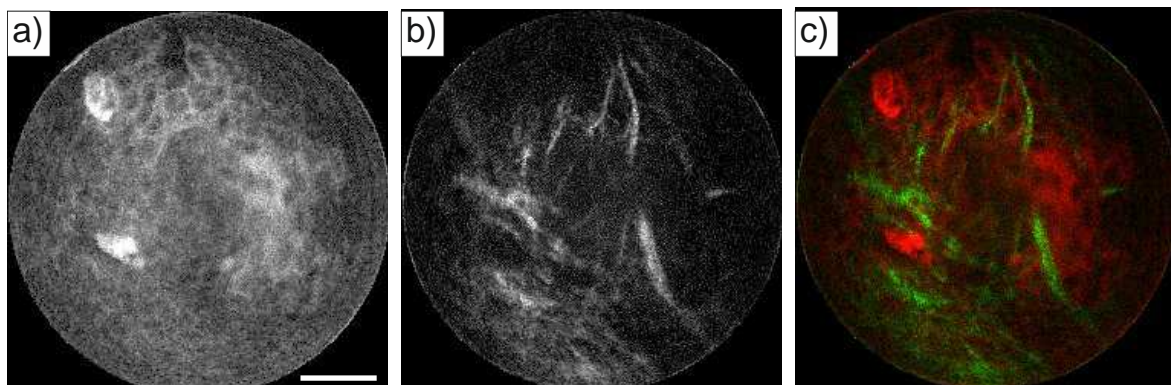


Figure 138 : Image moyennée sur 2 acquisitions d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

IV. Observations avec l'endomicroscope *in vivo* de tissus vivants non marqués

1. Protocole expérimental

Plusieurs souris ont été préparées pour l'expérience. Celles-ci présentaient différents stades de développement de la maladie, à 6 jours et à 13 jours. Pendant toute l'expérience la souris est anesthésiée. A la fin de l'expérience elle est euthanasiée avant son réveil. Dans un premier temps, elle est pesée afin de déterminer la dose d'anesthésiant nécessaire. Puis elle est anesthésiée par injection. Une fois l'animal endormi, un cathéter est placé sur son ventre au niveau du péritoine, afin de permettre la réinjection de l'anesthésique en cas de besoin. Un analgésique antidouleur est injecté à l'animal. Sa peau est ensuite rasée. 15 minutes après les injections, l'anesthésie est considérée comme profonde. La peau ainsi que la couche musculaire sont alors incisées. Le rein, qui est normalement situé sous la couche musculaire, est sorti à l'extérieur de l'organisme en passant par l'incision. Le rein n'est pas endommagé. Il reste relié à l'organisme de façon normale ce qui préserve son fonctionnement. Après cette étape, le rein repose sur la peau, toujours attaché au reste du corps par les vaisseaux sanguins et l'uretère (Figure 139).



Figure 139 : Photo de la souris après l'opération ayant pour but de sortir le rein.

Le rein étant à l'air libre, il est préférable de le recouvrir de gel échographique afin qu'il ne sèche pas. La souris est placée sur un tapis chauffant réglé sur 36°C. Le rein posé tel quel sur la peau va suivre les mouvements de la respiration et les battements du cœur de la souris (approximativement 150 par minute). Pour limiter les mouvements du rein, celui-ci est maintenu délicatement sur les côtés à l'aide de deux abaisses langues tenus par un système de positionnement. La souris est alors prête pour l'observation (Figure 140).

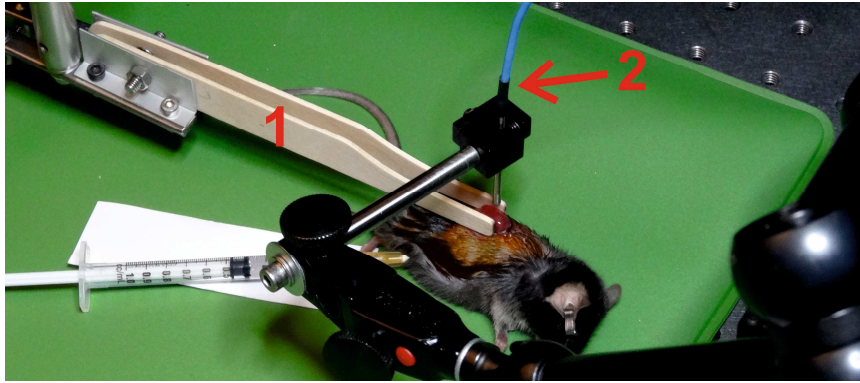


Figure 140 : Photo de la souris lors de l'observation avec l'endomicroscope ; 1 : abaisses langue servant à maintenir le rein ; 2 : endomicroscope multiphotonique.

La sonde distale de l'endomicroscope est tenue par un bras articulé, qui est visible au premier plan de la Figure 140, et qui est lui-même solidaire d'une platine motorisée en 3D ayant une résolution sub-micronique. Lors des observations la pièce est dans le noir afin de réduire les sources de bruit optique. Cependant, un contrôle de l'état de la souris est nécessaire pendant l'anesthésie. Pour cela nous utilisons deux caméras sensibles à l'infrarouge (DCU224M, Thorlabs) associées à une lampe IR à 950 nm (Figure 141). Nous avons vérifié que ces sources lumineuses IR ne contribuaient pas au signal et pas au bruit donnés par l'endomicroscope. Une des caméras donne un grand champ. L'autre qui est munie d'un zoom permet de faire un focus sur le rein et de guider précisément le positionnement de la sonde de l'endomicroscope.

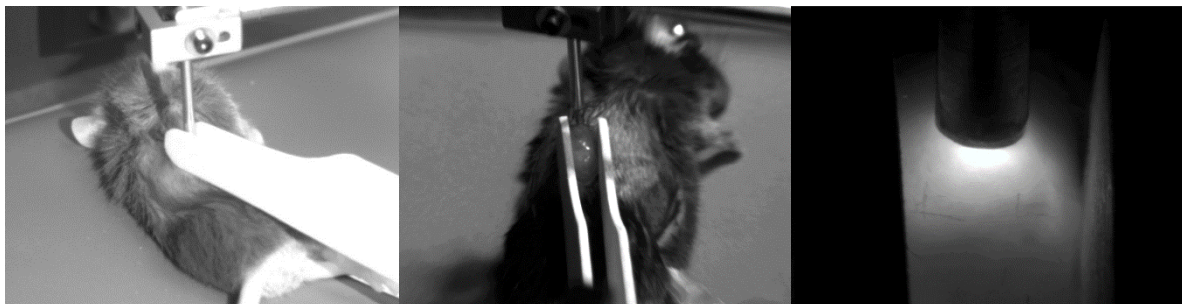


Figure 141 : Images de la souris données par les deux caméras de contrôle en éclairage IR à 950 nm ; Image de droite : zoom sur le rein.

2. Observations *in vivo*

Les images qui vont être présentées dans cette partie ont été acquises à l'aide de l'endomicroscope multiphotonique. Sauf mention contraire, les images ont été obtenues à une cadence de 8 images par seconde, avec 62500 pixels/image et seulement 35 mW sur les échantillons. Aucun colorant ni marqueur n'est utilisé durant cette expérience.

Nous avons commencé les tests avec une souris ayant une fibrose de 6 jours. L'endomicroscope permet d'acquérir des images de qualité très satisfaisante (Figure 142). Les mouvements de l'animal ne perturbent pas la prise d'images qui a lieu à la cadence de 8 par seconde. Les tubules sont clairement identifiables en 2PEF.

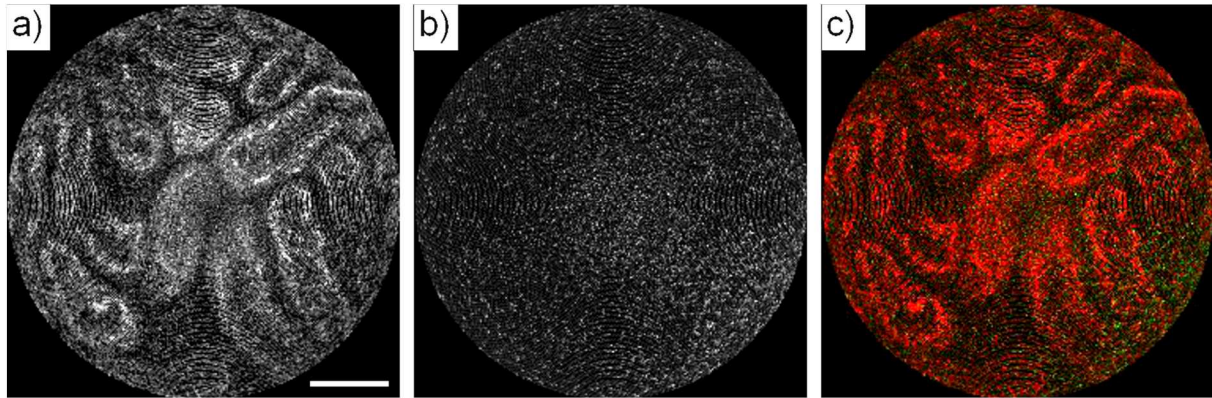


Figure 142 : Image d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

Malgré de nombreuses recherches à différents endroits sur le rein, aucune trace de collagène interstitiel et donc de fibrose n'a pu être observée sur ce rein fibrosé à 6 jours.

Par contre, le dispositif nous a tout de même permis d'acquérir des images en génération de seconde harmonique de la capsule rénale. La capsule rénale est une très fine membrane de 5 μm d'épaisseur faite de fibres collagène entourant tout le rein. On devine déjà la capsule sur l'image de droite de la Figure 142. La Figure 143 montre des images qui sont issues du moyennage de 4 acquisitions successives. L'image en SHG montre très nettement cette capsule. Ce résultat est très satisfaisant. En effet les deux équipes de recherche qui ont été citées au Chapitre 2 et qui ont été les seules à mener des expériences similaires (i.e. endomicroscopie multiphotonique sur animal vivant avec dans les deux cas l'imagerie du rein) ne sont pas parvenu à imager cette capsule.

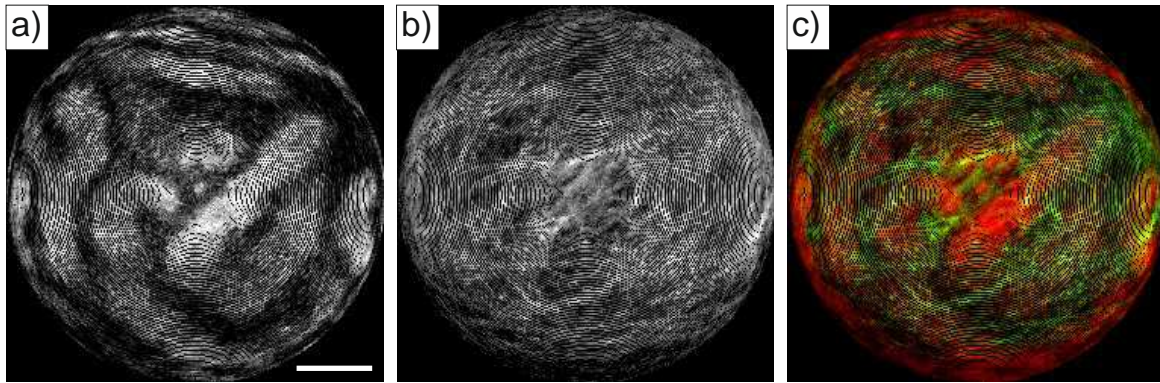


Figure 143 : Image moyennée sur 4 acquisitions de la capsule entourant le rein réalisée l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm .

La Figure 144 comporte un lien vers une vidéo qui a été prise lors de l'expérience.

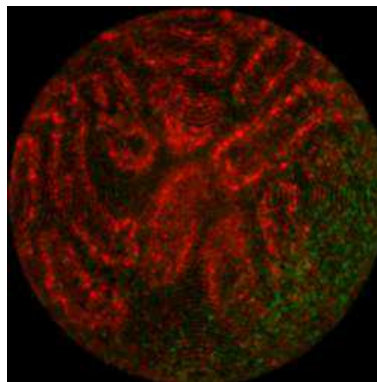


Figure 144 : Vidéo d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique sur animal vivant anesthésié sans marquage ; rouge : réponse en 2PEF des tubules rénaux ; vert : réponse en SHG de la capsule rénale en bas à droite. La prise de vue et la diffusion de la vidéo sont à la même cadence (i.e. 8 images par secondes)

Lien : <http://mediacenter.unilim.fr/videos/?video=MEDIA140718191310206>

Celle-ci correspond à l'acquisition d'une séquence d'images en temps réelle à 8 images par seconde. L'endomicroscope est suffisamment rapide pour ne pas être perturbé par les mouvements de l'animal.

On constate qu'il n'y a plus de fibrose détectable sur cet enregistrement.

La recherche de fibrose sur rein à 6 jours ayant donné un résultat négatif, nous sommes passés sur un rein à 13 jours. Cette fois-ci l'endomicroscope est réglé pour fournir 4 images de 202 500 pixels par seconde, avec un champ de l'ordre de 450 μm . Ces réglages permettent de couvrir une plus grande zone d'observation (voir Figure 145).

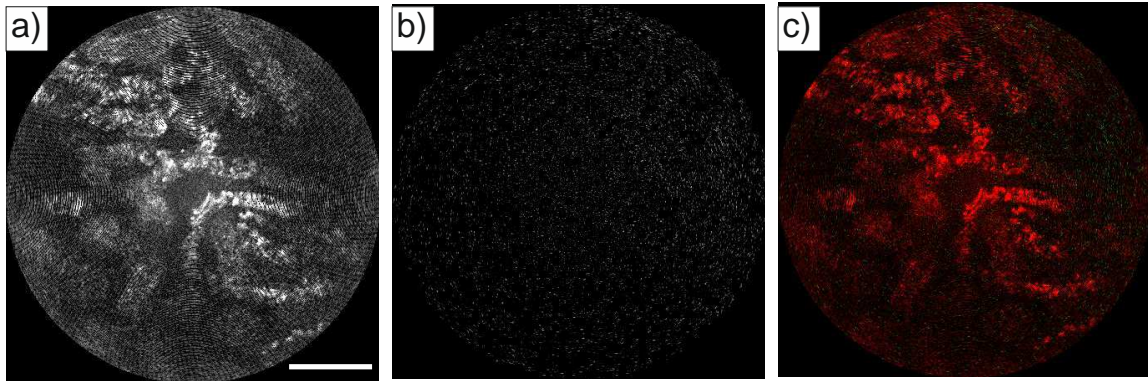


Figure 145 : Image d'un rein fibrosé à 13 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 100 μ m.

La Figure 146 comporte un lien vers une partie de l'acquisition. Nous pouvons voir sur cette vidéo des passages sur la capsule rénale.

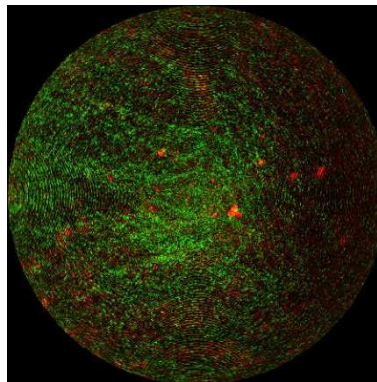


Figure 146 : Vidéo de l'acquisition d'une séquence image d'un rein fibrosé à 13 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; champ de 450 μ m

Lien : <http://mediacenter.unilim.fr/videos/?video=MEDIA140718233029866>

Cet essai sur rein fibrosé à 13 jours n'a malheureusement pas non plus permis de mettre en évidence la fibrose.

Des tests ex-vivo ont eu lieu par la suite sur des coupes de rein fibrosé entier afin de trouver des raisons à cet échec. Ils ont révélé que la fibrose était comme on peut s'y attendre localisée surtout à l'intérieur du rein et beaucoup moins en périphérie sous la capsule. Détecter du collagène fibrotique quelques centaines de microns sous la surface du rein à un stade précoce est un challenge particulièrement difficile. Pour y parvenir il pourrait-être intéressant de tester à l'avenir des lentilles grins à forte ouverture numérique qui donnent comme nous l'avons vu

au Chapitre 5, beaucoup plus de signal (voir notamment Figure 116). Il faudrait alors vérifier que les réductions de la distance de travail et de la taille du champ qui caractérisent ces lentilles ne sont pas trop pénalisantes lors d'expériences *in vivo*.

Malgré l'incapacité à détecter la fibrose lors de nos expériences *in vivo*, nous pouvons cependant être très satisfaits car l'observation de la capsule collagénique du rein est une première qui prouve si besoin est, l'efficacité de l'endomicroscope multiphotonique qui a été développé pendant cette thèse. Comme cela va être expliqué ci-dessous de nombreuses perspectives applicatives accompagnent ces résultats novateurs.

Lors des expériences qui viennent d'être présentées, nous avons fait des essais d'imagerie sur trois dimensions *in vivo*. Nous nous sommes alors aperçus qu'il est très difficile de déterminer la profondeur exacte de chaque acquisition. En effet la respiration et le rythme cardiaque de la souris se traduisent par un déplacement en z de l'échantillon. Il existe alors deux solutions. Il est possible de maintenir plus fermement le rein afin de réduire l'excursion en z. Il est aussi envisageable de synchroniser l'acquisition d'une image avec le mouvement du rein afin d'obtenir une représentation sur trois dimension fiable du tissu. Nous avons toutefois réalisé des essais sur une souris *post mortem*. La gestion de la profondeur d'observation est réalisée par une platine NanoMax commandée par des micromoteurs (MAX343/M, Thorlabs).

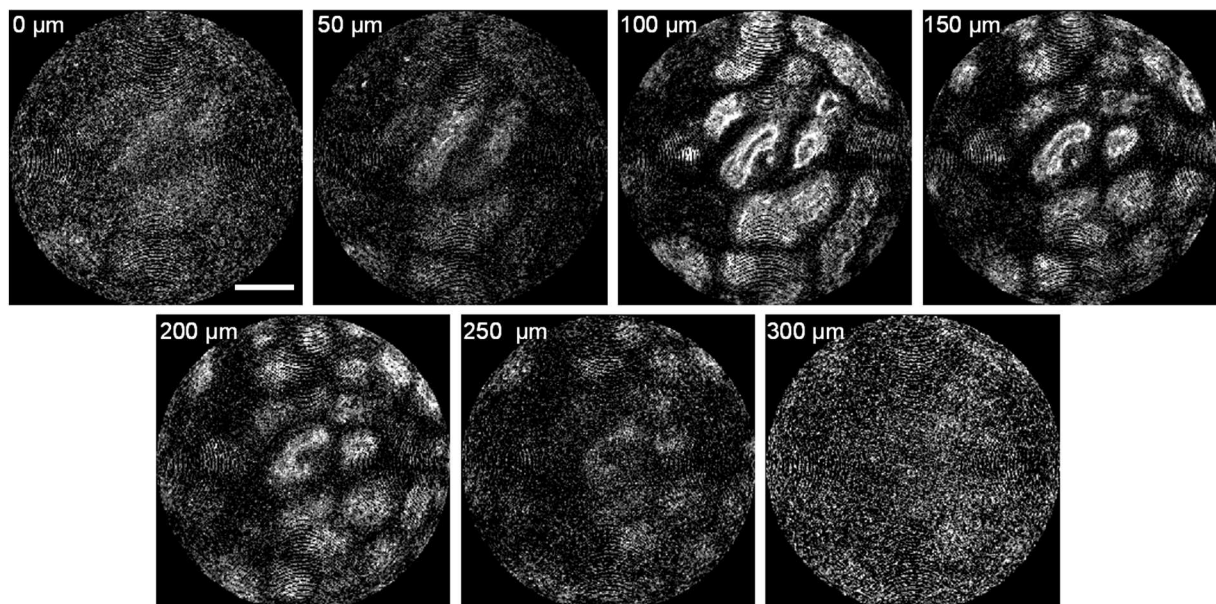


Figure 147 : Image de fluorescence à deux photons d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée l'endomicroscope multiphotonique à différentes profondeurs sous la surface du tissu ; barre d'échelle : 50 μm ; 62500 pixels/image ; 8 image/s et 1.4 μs /pixel.

La Figure 124 présente des acquisitions à différentes profondeurs. Le dispositif nous a permis d'obtenir des images jusqu'à 300 μm sous la surface de l'échantillon pulmonaire. Au-delà de cette profondeur, le signal devient très faible et nécessite des temps d'exposition plus importants.

Résumé du Chapitre 6

Le chapitre 6 porte sur la validation de l'endomicroscope multiphotonique au travers de la mise en place d'une application *in vivo* sur animal anesthésié. Ce travail a porté sur la fibrose rénale chez la souris. La fibrose étant liée à un dépôt anormal de fibres de collagène, la microscopie multiphotonique de génération de seconde harmonique du collagène est tout indiquée pour le dépistage de ce type de pathologie.

Dans le cas de la fibrose, le développement des fibres de collagène est désorganisé spatialement et celles-ci sont peu denses notamment lorsque le stade d'avancement de la maladie est précoce. L'observation de la fibrose est alors difficile. Cette étude a donc débuté progressivement avec l'observation du collagène se situant autour des artères à l'aide de différents dispositifs tels qu'un microscope de table classique (lumière blanche polarisée ou non), le microscope multiphotonique fibré et enfin l'endomicroscope multiphotonique.

Vient ensuite une présentation de différents stades d'avancement de la fibrose rénale observés en fluorescence à deux photons et en génération de seconde harmonique. Grâce à ces tests, nous avons pu voir que les dispositifs développés (voir chapitre 4 et 5) sont compatibles avec l'observation de la fibrose.

Des premiers tests *in vivo* sur des souris anesthésiées sont alors réalisés avec l'endomicroscope multiphotonique à 8 images par seconde et seulement 35 mW. Au cours de ceux-ci, aucune trace de fibrose n'a été détectée. Cependant, des essais ultérieurs nous ont appris que dans les reins étudiés, la fibrose était localisée au centre de l'organe, donc trop profondément dans les tissus pour la configuration actuelle de l'endomicroscope. Néanmoins, ces expériences ont permis l'acquisition d'images de la capsule rénale en SHG. Celle-ci est très fine (environ 5 μm) et n'a jamais été observée en endomicroscopie multiphotonique *in vivo*.

Pour finir, des acquisitions jusqu'à une profondeur dans les tissus de 300 μm sont présentées. Ces dernières sont obtenues post mortem sur le rein d'une souris.

Conclusion générale

Mes travaux de recherche ont principalement porté sur le développement d'un endomicroscope multiphotonique pour la biologie et la médecine.

Ce manuscrit a été l'occasion de réaliser une présentation générale de la microscopie multiphotonique. Nous avons abordé le principe et l'architecture des microscopes de fluorescence à deux photons (en anglais : Two-Photon Excited Fluorescence, 2PEF) et de génération de seconde harmonique optique (en anglais : Second-Harmonic Generation, SHG). Nous avons discuté des avantages et des inconvénients de ce type d'appareil. Enfin, plusieurs exemples d'applications innovantes dans le domaine biomédical ont été présentés. Malheureusement, ces dernières sont encore limitées à la microscopie de table. C'est pourquoi, de nombreux groupes de chercheurs travaillent activement sur le développement d'outils permettant de transposer la microscopie multiphotonique *in vivo in situ*. La mise au point d'un tel instrument permettrait d'ouvrir de nouvelles opportunités dans les domaines du diagnostic médical et de la recherche en biologie. Actuellement, seuls deux groupes de recherche sont parvenus à développer un endomicroscope multiphotonique miniature performant, capable de réaliser des images *in vivo in situ* sur animal vivant anesthésié. Néanmoins certaines limitations se présentent encore.

Ma thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de Mickaël Lelek, Claire Lefort et Meri Kalashyan. Ces derniers ont principalement consacré leurs travaux à la mise en forme spectrale et temporelle d'impulsions femtosecondes dans le but de les acheminer au travers d'une fibre optique. J'ai ainsi pu mettre à profit leurs travaux pour développer un microscope multiphotonique fibré. Ce dernier est alimenté par 5 mètres d'une fibre optique double gaine à petit cœur central, microstructurée air-silice, optimisée pour une utilisation en biophotonique. Cette fibre est le fruit d'une étroite collaboration avec le laboratoire PhLAM de l'Université de Lille 1. Ce microscope multiphotonique fibré possède des caractéristiques proches de celles des microscopes multiphotoniques non fibrés commerciaux. Il nous a entre autres permis d'acquérir des images haute résolution (résolution latérale = 0,39 μm) de tissus pulmonaires humains sains non marqués, jusqu'à des profondeurs de pénétration de l'ordre de 350 μm . Ces images ont été obtenues avec de faibles puissances moyennes d'excitation ($< 30 \text{ mW}$) (voir chapitre 4). Ses performances très satisfaisantes nous ont amené à intégrer ce dispositif à la plateforme Instrumentation Optique et Laser (OPTOLAS) du laboratoire XLIM, afin de proposer son utilisation

aux différents acteurs de la recherche en biophotonique et en médecine, sur les plans régional et national.

J'ai ensuite travaillé sur la miniaturisation de la sonde distale dans le but de réaliser un endomicroscope multiphotonique. Celle-ci est composée d'un système de balayage doublement résonant à actionnement piézoélectrique et d'une micro-optique sur mesure. Mes travaux ont finalement abouti au développement d'un endomicroscope multiphotonique aux performances inédites. Cet instrument présente entre autres une excitation optimisée avec des impulsions inférieures à 60 fs en sortie de 5 mètres de fibre optique. Cela lui permet d'exploiter des réponses endogènes de fluorescence à deux photons et de génération de seconde harmonique pour des puissances moyennes d'excitation inférieures à 30 mW. Ce dispositif a permis l'enregistrement d'images bimodales de tissus biologiques en 2PEF et SHG à la cadence de 8 images par seconde, à raison de 62500 pixels par images. Il présente une résolution latérale de 0,83 μm et délivre une taille de champ d'observation maximale de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$. Il a été possible d'obtenir des images en trois dimensions de tissus pulmonaires humains sains jusqu'à des profondeurs de 300 μm sous la surface des tissus (voir chapitre 5).

Afin de valider cet endomicroscope multiphotonique, nous l'avons exploité dernièrement pour de l'imagerie *in vivo* de reins fibrosés de souris. Ces observations ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire CRIBL de l'Université de Limoges. Plusieurs résultats inédits ont ainsi pu être obtenus, tels que l'image de la capsule rénale en SHG (épaisseur inférieure à 5 μm) et des profondeurs d'observation de l'ordre de 300 μm (voir chapitre 6).

Un tableau comparant les caractéristiques des différents endomicroscopes multiphotoniques ayant servi pour une application *in vivo* est donné en annexe B. On peut ainsi observer que le dispositif réalisé à Xlim présente d'excellentes performances en regard de ceux développés par d'autres groupes.

Les résultats très encourageants obtenus au cours de cette thèse ouvrent un grand nombre de perspectives qui sont décrites ci-dessous.

- **A court terme :**

Nous avons montré qu'il est envisageable de développer un microscope à main tel qu'évoqué au chapitre 4. Ce dispositif concurrencerait de manière significative le DermaInspect

(Jenlab) car il associerait des performances similaires à une maniabilité bien meilleure. Il s'agirait alors de modifier légèrement la tête actuelle du dispositif afin de faciliter la prise en main (ajout d'une poignée) ainsi qu'ajouter une gaine mécanique sécurisant la fibre et les câbles électriques.

De nouveaux essais sur la fibrose rénale sont prévus. Plusieurs modifications sont alors à l'étude : changement de la micro-optique (augmentations de la distance de travail et de l'ouverture numérique), et optimisation du système de comptage de photons (réduction du bruit).

Il est prévu que l'endomicroscope multiphotonique rejoigne le microscope multiphotonique fibré dans la plateforme Instrumentation optique et Laser (OPTOLAS) du laboratoire XLIM. Il sera alors mis à disposition d'utilisateurs dans le domaine biomédical, par exemple pour la recherche en cancérologie, en immunologie, en pneumologie ou encore en anatomopathologie. Pour cela, il est notamment nécessaire de mettre en place une gaine mécanique solidarisant efficacement le dispositif.

- **A moyen terme :**

Une amélioration conséquente consistera en l'ajout d'un balayage en profondeur de l'échantillon. Pour cela, deux voies sont envisagées. Il est possible de déplacer longitudinalement la fibre à l'intérieur de la sonde avec, par exemple, un mini moteur (Squiggle-motor, New Scale Technologie Inc.). L'autre solution serait d'utiliser une lentille à cristaux liquides (Evo-sens, Brest). Ce sujet est actuellement à l'étude dans le cadre du projet FIMSTO Physicancer (Fibered Multiphotonic Spectro-Tomograph).

En fluorescence, les spectres d'émission sont souvent superposés. Afin de distinguer deux fluorophores ayant des spectres se recouvrant, il est alors possible avec une mesure FLIM de déterminer le temps moyen de désexcitation propre à chacun. Un dispositif de comptage de photons résolu en temps (FLIM) ultra rapide est donc en cours de développement (Ikalogic, Limoges). La cible visée est le NADH. Plusieurs tests de compatibilité encourageants ont d'ores et déjà été réalisés au sein du groupe par Tigran Mansuryan et Pierre Leclerc. Pour aller plus loin, il sera cependant nécessaire de modifier la sonde imageuse afin d'augmenter le temps d'exposition de chaque pixel. Cela passera par l'allongement du bras de fibre (abaissement de la fréquence de résonance) diminuant donc le nombre d'images par seconde.

Une application dans les neurosciences est également à l'étude. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un DEFI Instrumentation aux limites (CNRS). Il demandera l'augmentation du nombre d'images par seconde permis par la sonde (25 images par seconde). Cette fois il sera donc nécessaire de réduire le bras de fibre (augmentation de la fréquence de résonnance).

- **A long terme :**

Un des objectifs plus lointains serait d'atteindre une miniaturisation ultime de la sonde imageuse (diamètre de 1 mm) [Seibel 08]. Il serait pour cela nécessaire de changer la céramique piézoélectrique, ainsi qu'utiliser des micro-optiques de plus petit diamètre. Ces dimensions permettraient alors de faire passer la sonde dans le canal opératoire d'un endomicroscope pulmonaire.

Une version plus avancée du dispositif FLIM pourrait permettre d'étudier le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (en anglais : Förster Resonance Energy Transfert, FRET).

La sonde imageuse pourrait aussi être exploitée pour d'autres modalités d'imagerie telles que la génération de troisième harmonique, la fluorescence à trois photons, la microscopie CARS (Coherent Anti-stokes Raman Scattering), la microscopie super-résolution (par exemple : déplétion par émission stimulée, en anglais : stimulated-emission-depletion, STED) [Gu 14], la tomographie par cohérence optique [Xi 12], l'imagerie polarimétrique de Mueller, etc.

Enfin, une utilisation pour la photothérapie dynamique (en anglais photodynamic therapy, PDT) n'est pas à écarter [Gu 10]. Ce sujet a déjà été initié lors de mon stage de master 2 et au début de ma thèse dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges. Je me suis alors intéressé à la caractérisation de molécules de type porphyrine.

Annexes

Annexe A : Acquisitions diverses réalisées à partir des dispositifs développés

Les différentes expériences réalisées au cours de ma thèse ont conduit à l'acquisition d'un grand nombre de résultats. Ces derniers ne figurent pas tous dans le corps du manuscrit. Cette annexe en présente une partie.

- **Mise en place d'un spectroscope.**

Cadre : collaboration avec le *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN ; EA 1069)* ayant pour sujet l'étude de nouvelles molécules porphyriniques pour la thérapie photo-dynamique à deux photons (en anglais two-photon photodynamic therapy, 2P-PDT).

Objectif : mise en place d'un spectroscope à prisme à haut rendement énergétique pour des mesures de section efficace d'absorption à deux photons de ces nouvelles molécules pour la 2P-PDT (Figure A1).

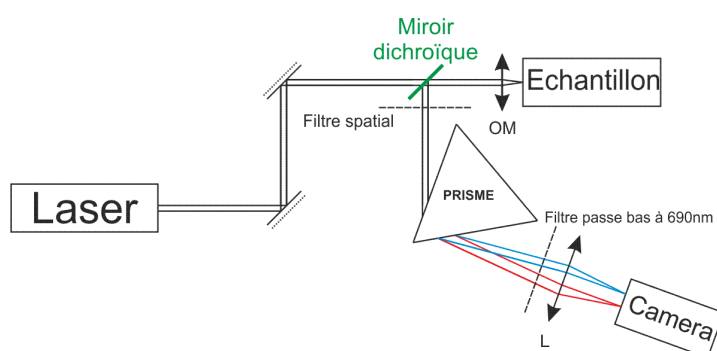


Figure A1 : Schéma expérimental du banc de mesure de section efficace d'absorption à deux photons ; laser : titane-saphir (800 nm, 76 MHz, 150 fs) ; Miroir dichroïque (FF510-Di01, Semrock) ; OM : Objectif de microscope (W Plan-Apochromat 63x/1.0, Zeiss) ; Filtre spatial (iris réglable) ; Prisme : Prisme en silice fondue ; Filtre : Filtre passe bas à 690 (XVS0690, Asahi Spectra) ; Caméra : ORCA II ERG (C4742-98-24ERG, Hamamatsu) ; L : lentille d'une focale de 7 mm

La mise en place de ce banc de mesure (Figure A2) a été réalisée en collaboration avec Hécctor González, qui était doctorant à l'Université de Saint Jacques de Compostelle (Espagne) en visite dans le laboratoire XLIM d'octobre à décembre 2011. Le banc de spectroscopie est contrôlé par LabVIEW.



Figure A2 : Photos du banc de spectroscopie.

Nous avons réalisé la mesure du spectre d'émission de l'eau. On peut voir sur la Figure A5, deux pics d'émission. Le premier est identifié comme une réponse de génération de diffusion harmonique de lumière ou encore de diffusion hyper-Rayleigh (milieu liquide) (voir Chapitre 1 : I. 1. a. ii. 3^{ème} cas). Le deuxième semblerait provenir des impuretés contenues dans l'eau. La coupure de ce dernier à environ 510 nm est due à la bande de réflexion du miroir dichroïque (FF510-Di01, Semrock).

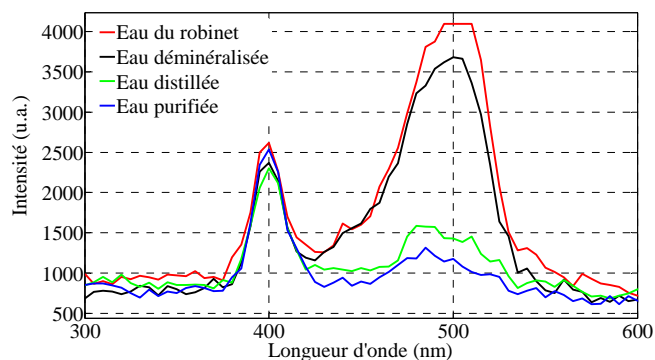


Figure A3 : Spectre d'émission d'eau de différentes provenances.

Dans le but de confirmer une réponse en diffusion hyper-Rayleigh, nous avons effectué une mesure du spectre pour différentes longueurs d'onde d'excitation (Figure A4). On observe bien un décalage en longueur d'onde du premier pic, ce qui est cohérent avec de la diffusion hyper-Rayleigh.

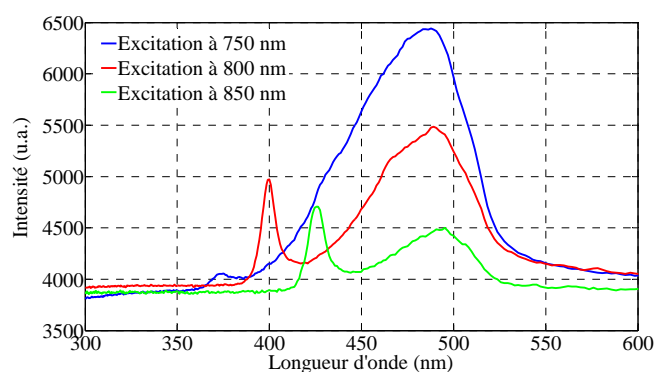


Figure A4 : Spectre d'émission de l'eau en fonction de la longueur d'onde.

- **Microscope multiphotonique fibré : complément d'acquisitions**
 - **Cellule de Tabac**

Cadre : collaboration avec des chimistes du *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN ; EA 1069)* ayant pour sujet l'étude de nouvelles molécules porphyriniques pour la thérapie photo-dynamique à deux photons (en anglais two-photon photodynamic therapy, 2P-PDT).

Objectif : observer et identifier les sources de réponse dans des cellules non marquées de tabac de type TBV-2 non chlorophylliennes (cette caractéristique ayant été perdue au fur et à mesure des cultures cellulaires) avant qu'elles ne soient marquées avec des molécules porphyriniques.

Conditions d'expérimentation : ces cellules de tabac ont été observées entre lame et lamelle dans leur milieu de culture sans aucun marquage à l'aide de notre microscope multiphotonique fibré.

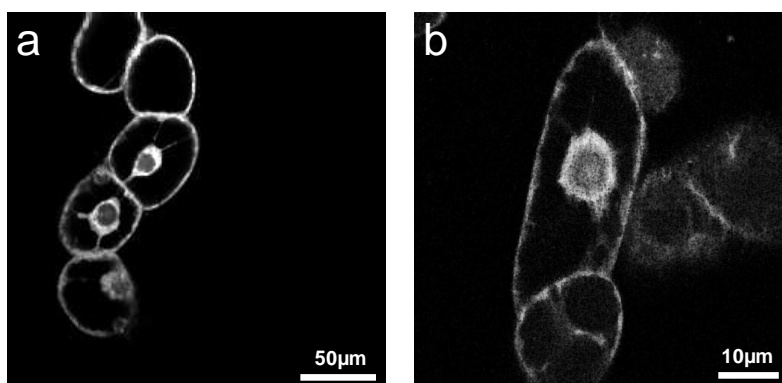


Figure A5 : Image en fluorescence à deux photons de cellules de tabac de type TBV-2 sans marquage.

Comme on peut le voir sur la Figure A5, la réponse en fluorescence endogène (non précisément identifiée) est localisée dans les parois cellulaires.

○ **Cerveau de souris**

Cadre : demande externe provenant du Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Objectif : imager deux cerveaux de souris différentes, le premier sain, et le second ayant une tumeur.

Conditions d'expérimentation : cerveaux entiers, fixés dans du paraformaldéhyde (4 %), puis conservés dans une solution saline, aucun marquage ni coloration. Découpe en tranches à l'aide d'un scalpel effectuée par Donald Peyrot avant observation, alors post doctorant dans le Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. Observation à 810 nm, 15 mW sur l'échantillon, 1 image par seconde ; 250×250 pixels² par image.

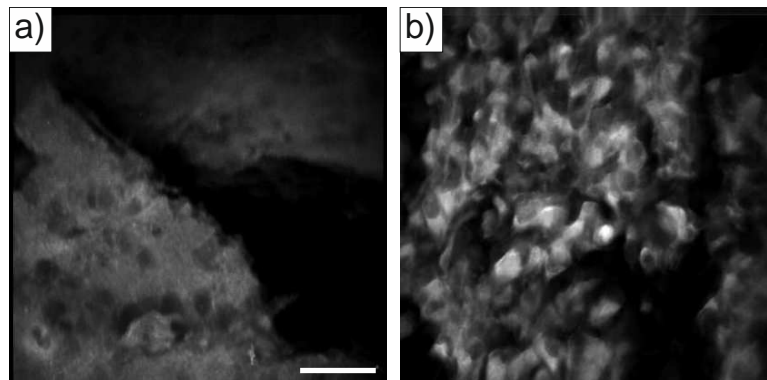


Figure A6 : Images en perspective en trois dimensions de cerveaux de souris obtenues en fluorescence à deux photons (Aucune réponse n'est détectée sur le canal SHG); (a) cerveau sain ; (b) cerveau ayant une tumeur ; barre d'échelle : 50 μ m.

○ **Fœtus de poulet**

Cadre : collaboration avec Rod O'Connor, titulaire de la Chaire Santé du Labex Sigma-Lim, à l'Institut de Recherche XLIM.

Objectif : identifier les sources de signal non linéaire dans un fœtus de poulet à l'aide du microscope multiphotonique fibré.

Conditions d'expérimentation : la préparation du fœtus a été réalisé par Sylvia Bardet Coste, qui était post doctorante au sein de l'équipe de Rod O'Connor. Le fœtus observé était âgé de 3 jours. Lors de cette acquisition, aucun colorant n'a été utilisé.

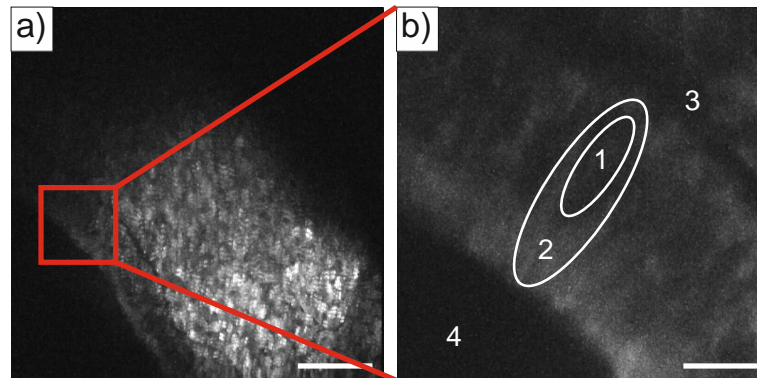


Figure A7 : Images de fœtus de poulet obtenues en fluorescence à deux photons ; (a) barre d'échelle : 50 μm ; (b) zoom sur la partie encadrée de l'image (a) ; barre d'échelle 10 μm ; 1 : noyau ; 2 : cytoplasme ; 3 : mésoderme ; 4 : fluide cérébrospinal.

○ Tissus d'Aorte

Cadre : demande externe provenant de Elisabeth GÉNOT, directeur de recherche Inserm, Université Bordeaux Segalen.

Objectif : observation de tissus d'aorte.

Conditions d'expérimentation : tissus fixés dans du paraformaldéhyde (0,5 %), puis conservés dans une solution saline, aucune coloration. Observation à 810 nm, 30 mW sur l'échantillon. 1 image par seconde, 500×500 pixels² par image.

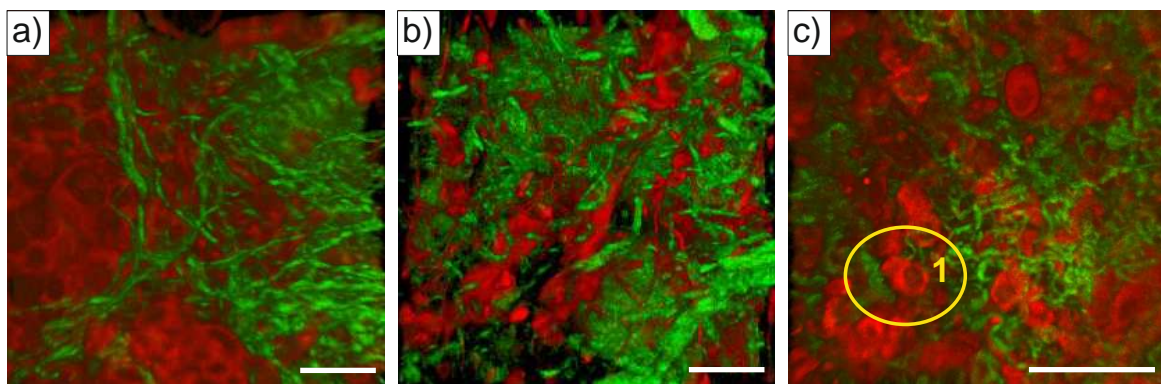


Figure A8 : Images en perspective en trois dimensions de tissus aortiques ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; (1) : globule rouge ; barre d'échelle : 50 μm ;

- **Endomicroscopie multiphotonique**
 - **Endomicroscope à balayage proximal**

Cadre : collaboration avec le Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (ANR « Invivo-ONL » ; 2009-2011).

Objectif : obtenir des images de tissus pulmonaires humains en génération de seconde harmonique et fluorescence à deux photons au travers d'un faisceau de fibre.

Conditions d'expérimentation : biopsies de bronches et d'alvéoles pulmonaires humaines saines, fixées dans du paraformaldéhyde (4 %), puis conservées dans une solution saline, aucune coloration. Observation à 800 nm, 20 mW sur l'échantillon. Acquisition en différé des images en 2PEF (25 secondes par image) et SHG (245 secondes par image) ; 6000 pixels par image. Contrôles du système de balayage, d'acquisition et de reconstruction effectués à partir de LabVIEW. Réalisé en collaboration avec Donald Peyrot, alors post doctorant dans le Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

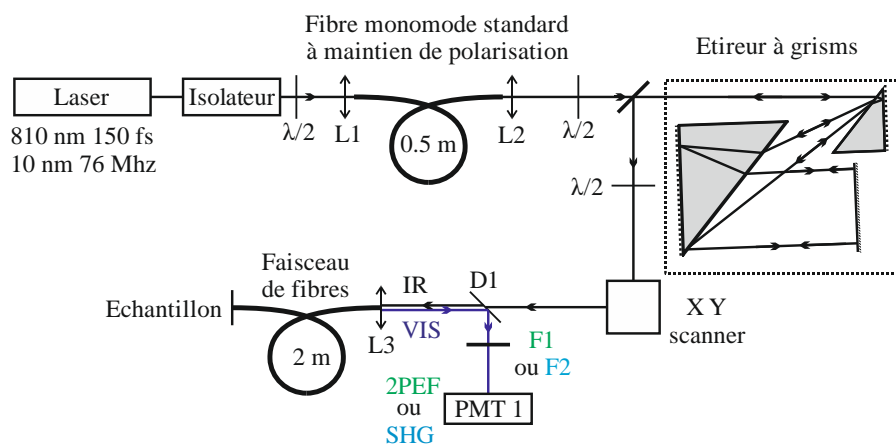


Figure A9 : Schéma expérimental de l'endomicroscope multiphotonique à balayage proximal. $\lambda/2$: lame demi-onde ; Li : lentilles de collimation et de focalisation (L1 : A375TM-B, Thorlabs ; L2 : C110TME-B, Thorlabs ; L3 : Lentille sur mesure (Mauna Kea Technologies) ; D1 : miroirs dichroïques (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; Fi : filtres (XVS0690, Asahi Spectra ; F2 : FB400-10, Thorlabs) ; XY scanner : miroirs galvanométriques (GVS 002, Thorlabs) ; PMT : Photomultiplicateur (H7422P-40, Hamamatsu).

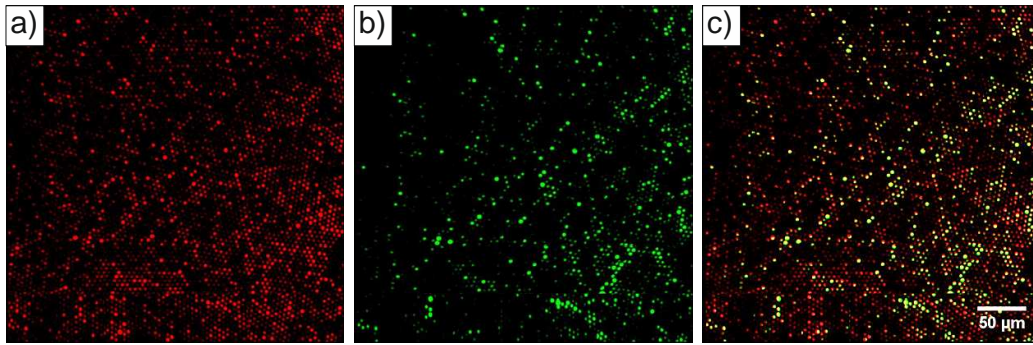


Figure A10 : Images d'un tissu de bronche humaine saine, réalisée au travers d'un faisceau de fibres sans optique distale (tissu en contact avec la fibre) ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) colocalisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG.

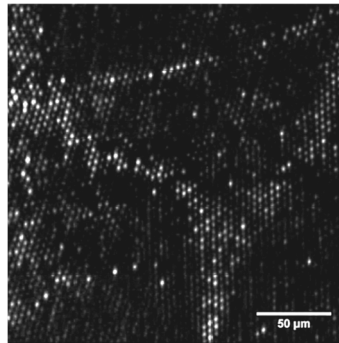


Figure A11 : Images d'alvéoles pulmonaires humaines saines, réalisées au travers d'un faisceau de fibres sans optique distale (tissu en contact avec la fibre) en fluorescence à deux photons.

○ Tissus pulmonaires

Cadre : collaboration avec le Laboratoire Jean Perrin, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (ANR « Invivo-ONL » ; 2009-2011).

Objectif : obtenir des images sur trois dimensions de tissus pulmonaires humains en génération de seconde harmonique et fluorescence à deux photons avec l'endomicroscope multiphotonique.

Conditions d'expérimentation : biopsie d'alvéoles pulmonaires humaines saines, fixées dans du paraformaldéhyde (4 %), puis conservées dans une solution saline, aucune coloration. Observation à 810 nm, 30 mW sur l'échantillon. 8 images par seconde.

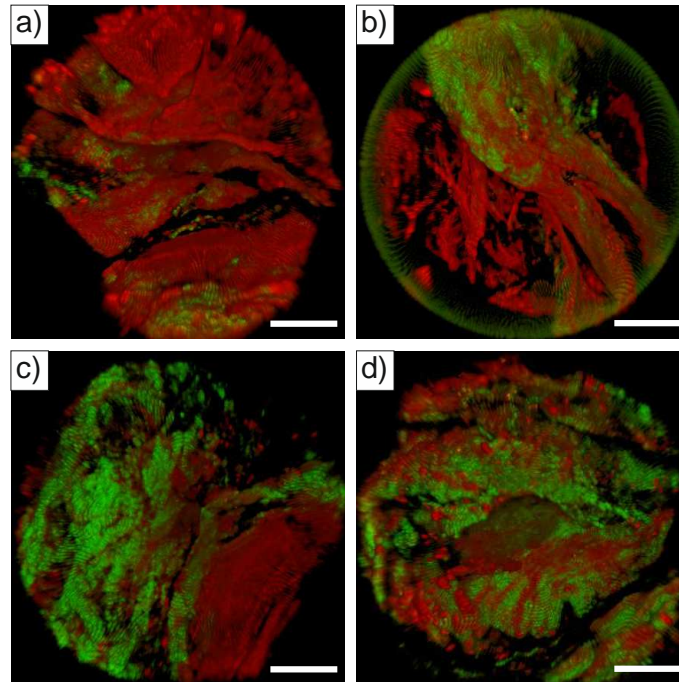


Figure A12 : Images en perspective en trois dimensions de tissus d'alvéoles pulmonaires humaines saines ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm ;

○ **Tissus d'Aorte**

Cadre : demande externe provenant de Elisabeth GÉNOT, directeur de recherche Inserm, Université Bordeaux Segalen.

Objectif : observation de tissus d'aorte.

Conditions d'expérimentation : tissus fixés dans du paraformaldéhyde (0,5 %), puis conservés dans une solution saline, aucune coloration. Observation à 810 nm, 30 mW sur l'échantillon. 8 images par seconde.

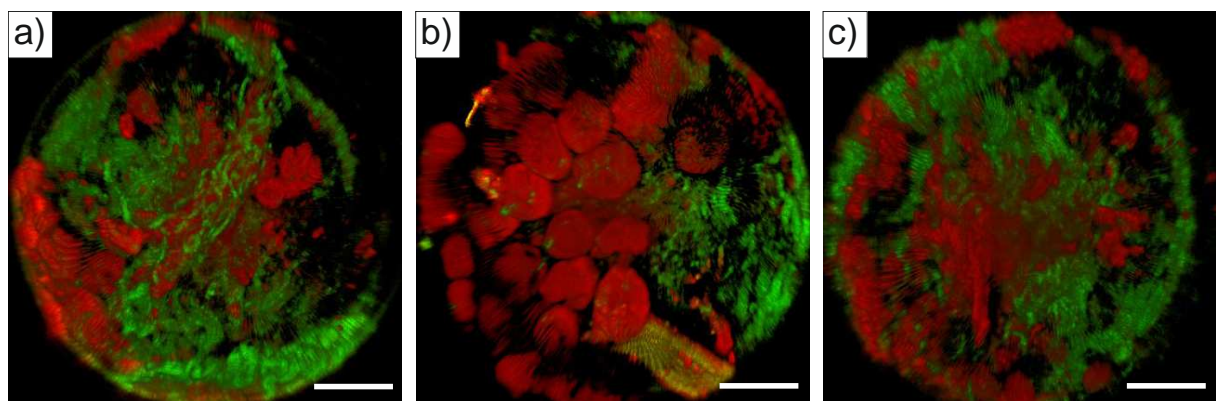


Figure A13 : Images en perspective en trois dimensions de tissus aortiques ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm ;

Annexe B : Tableau comparatif des endomicroscopes multiphotoniques utilisés *in vivo*

Caractéristiques	Cornell / Ouzounov 2013	Swinburne / Gu 2014	XLIM / Ducourthial 2014
Fibre	Fibre à cœur creux (HC-PBGF, HC-800-2, NKT Photonics). Cœur : 7,5 μm	Fibre DC (Fibercore) Cœur central : 3,6 μm Gaine collectrice : 105 μm	Fibre DC microstructurée (PhLAM) Cœur central : 3,55 μm Gaine collectrice : 188 μm
Longueur de fibre	1 m	2,9 m	5 m
Fibre dopée	Non	Oui	Non
Contrôle de la polarisation	Non	Non	Oui
Moyen de pré-compensation	Bloc de verre SF11	Etireur à réseaux	1 ^{ère} fibre + étireur à grisms
Scanner à fibre optique	Actionneur formé de deux céramique piézoélectriques (résonant / non résonant)	Actionneur électromagnétique (OptiScan) (résonant / non résonant)	Actionneur piézoélectrique tubulaire (doublement résonant)
Optique distale	Lentille catadioptrique sur mesure	Optique sur mesure	Assemblage de doublets achromatiques
Collection de la réponse	Couronne de fibres plastiques	Gaine collectrice de la fibre optique	Gaine collectrice de la fibre optique
Diamètre de la sonde endoscopique	5 mm	3 mm	2,2 mm
Poids de la sonde distale	-	> 60 g	1,2 g
Détection multimodale	Non (2PEF)	Non (2PEF ou SHG)	Oui (2PEF + SHG en simultané)
Détection en comptage de photons	Non	Non	Oui
Cible	Rein de rat	Rein de rat	Rein de souris
In vivo	Oui	Oui	Oui
Marquage	Non	Oui	Non
SHG in vivo	Non	Non	Oui
Cadence d'image	4,1 images/s mais moyenne sur 3 images	1,7 images/s	8 images/s
Champ d'observation	160×160 μm	475×475 μm	450×450 μm
Résolution latérale	0,8 μm	1 μm	0,8 μm
Résolution axiale	12 μm	20 μm	12 μm
Durée des impulsions	110 fs	>300 fs	40 fs
Puissance moyenne sur les tissus	60 mW	30 mW	30 mW
Profondeur de pénétration	140 μm	60 μm	300 μm

Bibliographie

- [Agrawal 01] G. Agrawal, *Nonlinear Fiber Optics*, Third Edition. A. Press, 2001.
- [Aguirre 10] A. D. Aguirre, J. Sawinski, S.-W. Huang, C. Zhou, W. Denk, and J. G. Fujimoto, “High speed optical coherence microscopy with autofocus adjustment and a miniaturized endoscopic imaging probe,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 5, pp. 4222–4239, Mar. 2010.
- [Andresen 13] E. R. Andresen, G. Bouwmans, S. Monneret, and H. Rigneault, “Two-photon lensless endoscope,” *Opt. Express*, vol. 21, no. 18, pp. 20713–20721, Sep. 2013.
- [Assayag 13] O. Assayag, K. Grieve, B. Devaux, F. Harms, J. Pallud, F. Chretien, C. Boccara, and P. Varlet, “Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissues with full-field optical coherence tomography,” *NeuroImage Clin.*, vol. 2, no. 0, pp. 549–557, 2013.
- [Bao 08] H. Bao, J. Allen, R. Pattie, R. Vance, and M. Gu, “Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a 475 μm x 475 μm field of view for in vivo imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 12, pp. 1333–1335, Jun. 2008.
- [Bao 10] H. Bao, A. Boussioutas, R. Jeremy, S. Russell, and M. Gu, “Second harmonic generation imaging via nonlinear endomicroscopy,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 2, pp. 1255–1260, Jan. 2010.
- [Bao 10 b] H. Bao, S. Y. Ryu, B. H. Lee, W. Tao, and M. Gu, “Nonlinear endomicroscopy using a double-clad fiber coupler,” *Opt. Lett.*, vol. 35, no. 7, pp. 995–997, Apr. 2010.
- [Batchelder 91] D. N. Batchelder, C. Cheng, and G. David Pitt, “Molecular imaging by Raman microscopy,” *Adv. Mater.*, vol. 3, no. 11, pp. 566–568, Nov. 1991.
- [Benninger 08] R. K. Benninger, W. J. Ashby, E. A. Ring, and D. W. Piston, “Single-photon-counting detector for increased sensitivity in two-photon laser scanning microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 24, pp. 2895–2897, 2008.
- [Bigot 07] L. Bigot and P. Roy, “Fibres à cristal photonique: 10 ans d’existence et un vaste champ d’applications,” *Images Phys.*, pp. 71–80, 2007.
- [Binnig 86] G. Binnig and D. Smith, “Single-tube three-dimensional scanner for scanning tunneling microscopy,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 57, no. 8, pp. 1688–1689, 1986.
- [Bjarklev 03] A. Bjarklev, A. S. Bjarklev, and J. Broeng, *Photonic Crystal Fibers*. Springer, 2003.
- [Boyd 03] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*. Elsevier Science, 2003.
- [Broeng 99] J. Broeng, D. Mogilevstev, S. E. Barkou, and A. Bjarklev, “Photonic Crystal Fibers: A New Class of Optical Waveguides,” *Opt. Fiber Technol.*, vol. 5, no. 3, pp. 305–330, Jul. 1999.
- [Brown 03] J., R. Malcom Brown, A. C. Millard, and P. J. Campagnola, “Macromolecular structure of cellulose studied by second-harmonic generation imaging microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 28, no. 22, pp. 2207–2209, Nov. 2003.

- [Brown 06] C. M. Brown, P. G. Reinhall, S. Karasawa, and E. J. Seibel, "Optomechanical design and fabrication of resonant microscanners for a scanning fiber endoscope," *Opt. Eng.*, vol. 45, no. 4, pp. 043001–043001–10, 2006.
- [Brown 12] C. M. Brown, D. R. Rivera, I. Pavlova, D. G. Ouzounov, W. O. Williams, S. Mohanan, W. W. Webb, and C. Xu, "In vivo imaging of unstained tissues using a compact and flexible multiphoton microendoscope," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 4, pp. 0405051–0405053, 2012.
- [Bruhat 61] G. Bruhat and A. Foch, *Mécanique*. Masson, 1961.
- [Brustlein 11] S. Brustlein, P. Berto, R. Hostein, P. Ferrand, C. Billaudeau, D. Marguet, A. Muir, J. Knight, and H. Rigneault, "Double-clad hollow core photonic crystal fiber for coherent Raman endoscope," *Opt. Express*, vol. 19, no. 13, pp. 12562–12568, 2011.
- [Burgold 11] S. Burgold, T. Bittner, M. Dorostkar, D. Kieser, M. Fuhrmann, G. Mitteregger, H. Kretzschmar, B. Schmidt, and J. Herms, "In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 121, no. 3, pp. 327–335, Mar. 2011.
- [Cao 94] X. D. Cao and D. D. Meyerhofer, "Frequency-domain interferometer for measurement of the polarization mode dispersion in single-mode optical fibers," *Opt. Lett.*, vol. 19, no. 22, pp. 1837–1839, Nov. 1994.
- [Chang 08] Y.-C. Chang, J. Y. Ye, T. Thomas, Y. Chen, J. R. Baker, and T. B. Norris, "Two-photon fluorescence correlation spectroscopy through a dual-clad optical fiber," *Opt. Express*, vol. 16, no. 17, pp. 12640–12649, Aug. 2008.
- [Chen 92] C. J. Chen, "Electromechanical deflections of piezoelectric tubes with quartered electrodes," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 60, no. 1, pp. 132–134, 1992.
- [Christie 01] R. H. Christie, "Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 3, pp. 858–864, Feb. 2001.
- [Chu 03] S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, H.-J. Tsai, and C.-K. Sun, "In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy," *Opt. Express*, vol. 11, no. 23, pp. 3093–3099, Nov. 2003.
- [Clark 01] S. W. Clark, F. O. Ilday, and F. W. Wise, "Fiber delivery of femto-second pulses from a Ti:sapphire laser," *Opt. Lett.*, vol. 26, no. 17, pp. 1320–1322, Sep. 2001.
- [D'Souza 11] J. D'Souza, J. Dharmadhikari, A. Dharmadhikari, B. Rao, and D. Mathur, "Effect of intense, ultrashort laser pulses on dna plasmids in their native state: Strand breakages induced by in situ electrons and radicals," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 106, no. 11, p. 118101, 2011.
- [Debarre 04] D. Debarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moulia, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, "Velocimetric third-harmonic genera-

- tion microscopy: micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos,” *Opt. Lett.*, vol. 29, no. 24, pp. 2881–2883, Dec. 2004.
- [Debarre 06] D. Debarre, “Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie,” 2006.
- [Denk 90] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, avril 1990.
- [Dhakal 13] K. Dhakal, L. Gu, B. Black, and S. K. Mohanty, “Fiber-optic two-photon optogenetic stimulation,” *Opt. Lett.*, vol. 38, no. 11, pp. 1927–1929, Jun. 2013.
- [Dharmadhikari 14] A. K. Dharmadhikari, H. Bharambe, J. A. Dharmadhikari, J. S. D’Souza, and D. Mathur, “DNA Damage by OH Radicals Produced Using Intense, Ultrashort, Long Wavelength Laser Pulses,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 112, no. 13, p. 138105, Apr. 2014.
- [Dombeck 03] D. A. Dombeck, K. A. Kasischke, H. D. Vishwasrao, M. Ingelsson, B. T. Hyman, and W. W. Webb, “Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 12, pp. 7081–7086, Jun. 2003.
- [Dombeck 10] D. A. Dombeck, C. D. Harvey, L. Tian, L. L. Looger, and D. W. Tank, “Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation,” *Nat Neurosci*, vol. 13, no. 11, pp. 1433–1440, Nov. 2010.
- [Duboisset 09] J. Duboisset, “Génération de second harmonique de biomolécules : des acides aminés aux protéines,” 2009.
- [Ducourthial 13] G. Ducourthial, C. Lefort, D. A. Peyrot, T. Mansuryan, S. Kruglik, C. Vever-Bizet, L. Thiberville, F. Lacombe, G. Bourg-Heckly, and F. Louradour, “Label free multiphoton imaging of human pulmonary tissues through two-meter-long microstructured fiber and multicore image-guide,” presented at the SPIE BiOS, 2013, vol. 8575, p. 85750H–85750H–11.
- [Emaury 13] F. Emaury, C. F. Dutin, C. J. Saraceno, M. Trant, O. H. Heckl, Y. Y. Wang, C. Schriber, F. Gerome, T. Südmeyer, F. Benabid, and U. Keller, “Beam delivery and pulse compression to sub-50 fs of a modelocked thin-disk laser in a gas-filled Kagome-type HC-PCF fiber,” *Opt. Express*, vol. 21, no. 4, pp. 4986–4994, Feb. 2013.
- [Engelbrecht 08] C. J. Engelbrecht, R. S. Johnston, E. J. Seibel, and F. Helmchen, “Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo,” *Opt. Express*, vol. 16, no. 8, pp. 5556–5564, Apr. 2008.
- [Ferrand 11] P. Ferrand, “Counting photons: from the instruments to the applications,” presented at the Institut Fresnel, MOSAIC group (<http://www.fresnel.fr/mosaic>), Lecture given to the students of the OPSI Master, 2011.
- [Flusberg 05] B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha, J. C. Jung, E. L. M. Cheung, and M. J. Schnitzer, “Fiber-optic fluorescence imaging,” *Nat Meth*, vol. 2, no. 12, pp. 941–950, Dec. 2005.

- [Flusberg 08] B. A. Flusberg, A. Nimmerjahn, E. D. Cocker, E. A. Mukamel, R. P. J. Barretto, T. H. Ko, L. D. Burns, J. C. Jung, and M. J. Schnitzer, “High-speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice,” *Nat Meth*, vol. 5, no. 11, pp. 935–938, Nov. 2008.
- [Freund 86] I. Freund and M. Deutsch, “Second-harmonic microscopy of biological tissue,” *Opt. Lett.*, vol. 11, no. 2, pp. 94–96, Feb. 1986.
- [Fu 06] L. Fu, A. Jain, H. Xie, C. Cranfield, and M. Gu, “Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a MEMS mirror,” *Opt. Express*, vol. 14, no. 3, pp. 1027–1032, Feb. 2006.
- [Fu 07] L. Fu and M. Gu, “Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy,” *J. Microsc.*, vol. 226, no. 3, pp. 195–206, Jun. 2007.
- [Gachet 07] D. Gachet, “Microscopie ‘CARS’ (Coherent anti-Stokes Raman scattering). Génération du signal au voisinage d’interfaces et à l’intérieur d’une cavité Fabry-Perot,” 2007.
- [Ghosh 11] K. Ghosh, L. Burns, E. Cocker, A. Nimmerjahn, Y. Ziv, A. Gamal, and M. Schnitzer, “Miniaturized integration of a fluorescence microscope,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 10, pp. 871–878, 2011.
- [Göbel 04] W. Göbel, A. Nimmerjahn, and F. Helmchen, “Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber,” *Opt. Lett.*, vol. 29, no. 11, pp. 1285–1287, Jun. 2004.
- [Göbel 04 b] W. Göbel, J. N. D. Kerr, A. Nimmerjahn, and F. Helmchen, “Miniaturized two-photon microscope based on a flexible coherent fiberbundle and a gradient-index lens objective,” *Opt. Lett.*, vol. 29, no. 21, pp. 2521–2523, Nov. 2004.
- [Goetz 07] M. Goetz, C. Fottner, E. Schirmacher, P. Delaney, S. Gregor, C. Schneider, D. Strand, S. Kanzler, B. Memadathil, E. Weyand, M. Holtmann, R. Schirmacher, M. M. Weber, M. Anlauf, G. Klöppel, M. Vieth, P. R. Galle, P. Bartenstein, M. F. Neurath, and R. Kiesslich, “In-vivo confocal real-time mini-microscopy in animal models of human inflammatory and neoplastic diseases,” *Endoscopy*, vol. 39, no. 04, pp. 350–356, Nov. 2007.
- [Göppert-Mayer 31] M. Göppert-Mayer, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen,” *Ann. Phys.*, vol. 401, no. 3, pp. 273–294, Jan. 1931.
- [Gu 10] M. Gu, H. C. Bao, and J. L. Li, “Cancer-cell microsurgery using nonlinear optical endomicroscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 5, pp. 050502–050502–3, Oct. 2010.
- [Gu 14] M. Gu, H. Kang, and X. Li, “Breaking the diffraction-limited resolution barrier in fiber-optical two-photon fluorescence endoscopy by an azimuthally-polarized beam,” *Sci Rep*, vol. 4, Jan. 2014.
- [Gu 14 b] M. Gu, H. Bao, and H. Kang, “Fibre-optical microendoscopy,” *J. Microsc.*, vol. 254, no. 1, pp. 13–18, Apr. 2014.
- [Le Harzic 08] R. Le Harzic, M. Weinigel, I. Riemann, K. König, and B. Messerschmidt, “Nonlinear optical endoscope based on a compact two axes piezo scanner and a miniature objective lens,” *Opt. Express*, vol. 16, no. 25, pp. 20588–20596, Dec. 2008.

- [Helmchen 01] F. Helmchen, M. S. Fee, D. W. Tank, and W. Denk, "A Miniature Head-Mounted Two-Photon Microscope: High-Resolution Brain Imaging in Freely Moving Animals," *Neuron*, vol. 31, no. 6, pp. 903–912, Sep. 2001.
- [Helmchen 05] F. Helmchen and W. Denk, "Deep tissue two-photon microscopy," *Nat Meth*, vol. 2, no. 12, pp. 932–940, Dec. 2005.
- [Helmchen 13] F. Helmchen, W. Denk, and J. N. D. Kerr, "Miniaturization of Two-Photon Microscopy for Imaging in Freely Moving Animals," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2013, no. 10, p. pdb.top078147, Oct. 2013.
- [Hernandez 04] F. E. Hernandez, K. D. Belfield, I. Cohanoschi, M. Balu, and K. J. Schafer, "Three- and Four-Photon Absorption of a Multiphoton Absorbing Fluorescent Probe," *Appl. Opt.*, vol. 43, no. 28, pp. 5394–5398, Oct. 2004.
- [Hiramatsu 12] K. Hiramatsu, M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, "Observation of Raman optical activity by heterodyne-detected polarization-resolved coherent anti-Stokes Raman scattering," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 109, no. 8, p. 083901, 2012.
- [Hompland 08] T. Hompland, A. Erikson, M. Lindgren, T. Lindmo, and C. de Lange Davies, "Second-harmonic generation in collagen as a potential cancer diagnostic parameter," *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 5, pp. 054050–054050–11, 2008.
- [Hopt 01] A. Hopt and E. Neher, "Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 4, pp. 2029–2036, 2001.
- [Horton 13] N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, and C. Xu, "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain," *Nat. Photonics*, vol. 7, no. 3, pp. 205–209, 2013.
- [Huang 02] S. Huang, A. A. Heikal, and W. W. Webb, "Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein," *Biophys J*, vol. 82, pp. 2811–2825, 2002.
- [Huo 10] L. Huo, J. Xi, Y. Wu, and X. Li, "Forward-viewing resonant fiber-optic scanning endoscope of appropriate scanning speed ?for 3D OCT imaging," *Opt. Express*, vol. 18, no. 14, pp. 14375–14384, Jul. 2010.
- [JenLab 12] JenLab, "Jenlab: 2P Endoscope," Nov-2012. [Online]. Available: <http://www.jenlab.de/2P-Endoscope.2pe.0.html?&L=en>. [Accessed: 15-Apr-2014].
- [JenLab] JenLab, "DermaInspect." [Online]. Available: <http://www.jenlab.de/Applications.42.0.html>.
- [Jung 08] W. Jung, S. Tang, D. T. McCormic, T. Xie, Y.-C. Ahn, J. Su, I. V. Tomov, T. B. Krasieva, B. J. Tromberg, and Z. Chen, "Miniaturized probe based on a microelectromechanical system mirror for multiphoton microscopy," *Opt. Lett.*, vol. 33, no. 12, pp. 1324–1326, Jun. 2008.

- [Jyothikumar 13] V. Jyothikumar, Y. Sun, and A. Periasamy, “Investigation of tryptophan–NADH interactions in live human cells using three-photon fluorescence lifetime imaging and Förster resonance energy transfer microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, pp. 060501–060501, 2013.
- [Kaiser 61] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, and D. L. Wood, “Fluorescence and Optical Maser Effects in CaF₂: Sm⁺⁺,” *Phys. Rev.*, vol. 123, no. 3, pp. 766–776, Aug. 1961.
- [Kalashyan 12] M. Kalashyan, “Novel nonlinear-optic methods for signal processing and delivery on femtosecond timescale,” Université de Limoges (France), Université de Erevan (Arménie), 2012.
- [Kalashyan 12 b] M. Kalashyan, C. Lefort, L. Martínez-León, T. Mansuryan, L. Mouradian, and F. Louradour, “Ultrashort pulse fiber delivery with optimized dispersion control by reflection gratings at 800 nm,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 23, pp. 25624–25635, Nov. 2012.
- [König 02] K. König, U. Wollina, I. Riemann, C. Peukert, K.-J. Halbhauer, H. Konrad, P. Fischer, V. Fuenfstueck, T. W. Fischer, and P. Elsner, “Optical tomography of human skin with subcellular spatial and picosecond time resolution using intense near infrared femtosecond laser pulses,” presented at the International Symposium on Biomedical Optics, 2002, pp. 191–201.
- [König 03] K. König and I. Riemann, “High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, no. 3, pp. 432–439, 2003.
- [Kundrat 11] M. J. Kundrat, P. G. Reinhold, C. M. Lee, and E. J. Seibel, “High performance open loop control of scanning with a small cylindrical cantilever beam,” *J. Sound Vib.*, vol. 330, no. 8, pp. 1762–1771, Apr. 2011.
- [Kwan 09] A. C. Kwan, K. Duff, G. K. Gouras, and W. W. Webb, “Optical visualization of Alzheimer’s pathology via multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation,” *Opt. Express*, vol. 17, no. 5, pp. 3679–3689, Mar. 2009.
- [Lee 10] C. M. Lee, C. J. Engelbrecht, T. D. Soper, F. Helmchen, and E. J. Seibel, “Scanning fiber endoscopy with highly flexible, 1 mm catheterscopes for wide-field, full-color imaging,” *J. Biophotonics*, vol. 3, no. 5–6, pp. 385–407, Mar. 2010.
- [Lefort 12] C. Lefort, “Transport d’impulsions femtosecondes par fibres optiques pour des applications à la biophotonique,” Université de Limoges, Limoges, 2012.
- [Lefort 14] C. Lefort, M. Kalashyan, G. Ducourthial, T. Mansuryan, R. P. O’Connor, and F. Louradour, “Sub-30-fs pulse compression and pulse shaping at the output of a 2-meter-long optical fiber in the near infrared range,” *Journal of the Optical Society of America*, Soumis pour publication en juin-2014.
- [Lelek 06] M. Lelek, “Caractérisation d’impulsions brèves. Mise en forme temporelle et Spectrale pour une application à l’endomicroscopie bi-photonique,” Université de Limoges, 2006.

- [Lelek 07] M. Lelek, E. Suran, F. Louradour, A. Barthelemy, B. Viellerobe, and F. Lacombe, "Coherent femtosecond pulse shaping for the optimization of a non-linear micro-endoscope," *Opt. Express*, vol. 15, no. 16, pp. 10154–10162, Aug. 2007.
- [Liang 12] W. Liang, K. Murari, Y. Zhang, Y. Chen, M.-J. Li, and X. Li, "Increased illumination uniformity and reduced photodamage offered by the Lissajous scanning in fiber-optic two-photon endomicroscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 2, pp. 0211081–0211085, 2012.
- [Liang 13] W. Liang, Y. Zhang, M. L. Akins, Y. Chen, Q. Mao, M.-J. Li, K. Glunde, Z. Bhujwalla, K. Luby-Phelps, M. Mahendroo, and X. Li, "Fiber optic nonlinear endomicroscopy for imaging biological tissues based on intrinsic contrast," presented at the SPIE BiOS, 2013.
- [Liu 13] N. Liu, J. Chen, R. Xu, S. Jiang, J. Xu, and R. Chen, "Label-free imaging characteristics of colonic mucinous adenocarcinoma using multiphoton microscopy," *Scanning*, vol. 35, no. 4, pp. 277–282, Jul. 2013.
- [Luengo-Oroz 12] M. A. Luengo-Oroz, J. L. Rubio-Guivernau, E. Faure, T. Savy, L. Duloquin, N. Olivier, D. Pastor, M. Ledesma-Carbayo, D. Debarre, P. Bourguine, E. Beaurepaire, N. Peyrieras, and A. Santos, "Methodology for Reconstructing Early Zebrafish Development From In Vivo Multiphoton Microscopy," *Image Process. IEEE Trans. On*, vol. 21, no. 4, pp. 2335–2340, Apr. 2012.
- [Luo 09] T. Luo, J. X. Chen, S. M. Zhuo, K. C. Lu, X. S. Jiang, and Q. G. Liu, "Visualization of collagen regeneration in mouse dorsal skin using second harmonic generation microscopy," *Laser Phys.*, vol. 19, no. 3, pp. 478–482, Mar. 2009.
- [Matteau-Pelletier 13] C. Matteau-Pelletier, "Développement d'un système d'imagerie photoacoustique pour application à l'athérosclérose," Université de Montréal, 2013.
- [Matteini 09] P. Matteini, F. Ratto, F. Rossi, R. Cicchi, C. Stringari, D. Kapsokalyvas, F. S. Pavone, and R. Pini, "Photothermally-induced disordered patterns of corneal collagen revealed by SHG imaging," *Opt. Express*, vol. 17, no. 6, pp. 4868–4878, Mar. 2009.
- [Mauna Kea Technologies] Mauna Kea Technologies, *Mauna Kea Technologies*. [Online]. Available: <http://www.maunakeatech.com/fr/>.
- [McCarter 13] J. McCarter, S. Liebscher, T. Bachhuber, C. Abou-Ajram, M. Hübener, B. Hyman, C. Haass, and M. Meyer-Luehmann, "Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of Alzheimer's disease," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 126, no. 2, pp. 179–188, Aug. 2013.
- [Mertz 01] J. Mertz and L. Moreaux, "Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers," *Opt. Commun.*, vol. 196, no. 1–6, pp. 325–330, Sep. 2001.
- [Mizutani 00] G. Mizutani, Y. Sonoda, H. Sano, M. Sakamoto, T. Takahashi, and S. Ushioda, "Detection of starch granules in a living plant by optical second harmonic microscopy," *J. Lumin.*, vol. 87–89, no. 0, pp. 824–826, May 2000.

- [Murari 11] K. Murari, Y. Zhang, S. Li, Y. Chen, M.-J. Li, and X. Li, “Compensation-free, all-fiber-optic, two-photon endomicroscopy at 1.55 μm ,” *Opt. Lett.*, vol. 36, no. 7, pp. 1299–1301, 2011.
- [Murayama 07] M. Murayama, E. Pérez-Garci, H.-R. Lüscher, and M. E. Larkum, “Fiberoptic System for Recording Dendritic Calcium Signals in Layer 5 Neocortical Pyramidal Cells in Freely Moving Rats,” *J. Neurophysiol.*, vol. 98, no. 3, pp. 1791–1805, Sep. 2007.
- [Myaing 06] M. T. Myaing, D. J. MacDonald, and X. Li, “Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope,” *Opt. Lett.*, vol. 31, no. 8, pp. 1076–1078, 2006.
- [Okuno 12] M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, “Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a nanosecond supercontinuum light source,” *Fiber Supercontinuum Sources Their Appl.*, vol. 18, no. 5, pp. 388–393, Sep. 2012.
- [Olivier 10] N. Olivier, M. A. Luengo-Oroz, L. Duloquin, E. Faure, T. Savy, I. Veilleux, X. Solinas, D. Débarre, P. Bourguine, and A. Santos, “Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy,” *Science*, vol. 329, no. 5994, pp. 967–971, Aug. 2010.
- [Oron 04] D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, and Y. Silberberg, “Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy,” *J. Struct. Biol.*, vol. 147, no. 1, pp. 3–11, 2004.
- [Ouzounov 13] D. G. Ouzounov, D. R. Rivera, W. O. Williams, J. A. Stupinski, T. L. Southard, K. H. Hume, J. Bentley, R. S. Weiss, W. W. Webb, and C. Xu, “Dual modality endomicroscope with optical zoom capability,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 9, pp. 1494–1503, Sep. 2013.
- [Pena 05] A. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, and M. Schanne-Klein, “Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy,” *Opt. Express*, vol. 13, no. 16, pp. 6268–6274, Aug. 2005.
- [Pena 06] A.-M. Pena, “Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l’étude de fibroses par microscopie multiphoton,” 2006.
- [Pena 07] A.-M. Pena, A. Fabre, D. Débarre, J. Marchal-Somme, B. Crestani, J.-L. Martin, E. Beaurepaire, and M.-C. Schanne-Klein, “Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 70, no. 2, pp. 162–170, Feb. 2007.
- [Peyrot 12] D. A. Peyrot, C. Lefort, M. Steffenhagen, T. Mansuryan, G. Ducourthial, D. Abi-Haidar, N. Sandeau, C. Vever-Bizet, S. G. Kruglik, L. Thiberville, F. Louradour, and G. Bourg-Heckly, “Development of a nonlinear fiber-optic spectrometer for human lung tissue exploration,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, no. 5, pp. 840–853, 2012.

- [Physik Instrumente] Physik Instrumente, “Tutorial: High Precision Piezo Positioner Mechanisms, NanoPositioning: Basic Designs of Piezoelectric Positioning Drives/Systems.” [Online]. Available: <http://www.physikinstrumente.com/en/products/prdetail.php?sortnr=400800.00>. [Accessed: 01-Apr-2014].
- [Pierangelo 11] A. Pierangelo, A. Benali, M.-R. Antonelli, T. Novikova, P. Validire, B. Gayet, and A. De Martino, “Ex-vivo characterization of human colon cancer by Mueller polarimetric imaging,” *Opt. Express*, vol. 19, no. 2, pp. 1582–1593, Jan. 2011.
- [Pierangelo 13] A. Pierangelo, A. Nazac, A. Benali, P. Validire, H. Cohen, T. Novikova, B. H. Ibrahim, S. Manhas, C. Fallet, M.-R. Antonelli, and A.-D. Martino, “Polarimetric imaging of uterine cervix: a case study,” *Opt. Express*, vol. 21, no. 12, pp. 14120–14130, Jun. 2013.
- [Piyawattanametha 09] W. Piyawattanametha, E. D. Cocker, L. D. Burns, R. P. J. Barretto, J. C. Jung, H. Ra, O. Solgaard, and M. J. Schnitzer, “In vivo brain imaging using a portable 2.9 g two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror,” *Opt. Lett.*, vol. 34, no. 15, pp. 2309–2311, Aug. 2009.
- [Plotnikov 06] S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola, and W. A. Mohler, “Characterization of the Myosin-Based Source for Second-Harmonic Generation from Muscle Sarcomeres,” *Biophys. J.*, vol. 90, no. 2, pp. 693–703, Jan. 2006.
- [Revillod 06] G. Revillod, “Diffusion hyper Rayleigh des assemblages moléculaires,” 2006.
- [Rigaud 03] F. Rigaud, J. Gounot, S. Dilhaire, M. Valat, and S. Jorez, “Oscillateur harmonique forcé, oscillations forcées-Etude de la phase des oscillations forcées en régime permanent en fonction de la pulsation de l’excitation,” *L’UNIVERSITE DES SCIENCES EN LIGNE*, 2003. [Online]. Available: http://uel.unisciel.fr/physique/syst_oscillants/syst_oscillants_ch04/co/apprendre_ch4_14.html.
- [Rivera 11] D. R. Rivera, C. M. Brown, D. G. Ouzounov, I. Pavlova, D. Kobat, W. W. Webb, and C. Xu, “Compact and flexible raster scanning multiphoton endoscope capable of imaging unstained tissue,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 43, pp. 17598–17603, 2011.
- [Roberts 00] D. A. Roberts and R. R. Syms, “1D and 2D laser line scan generation using a fiber optic resonant scanner,” in *Symposium on Applied Photonics*, 2000, pp. 62–73.
- [Roth 80] S. Roth and I. Freund, “Coherent optical harmonic generation in rat-tail tendon,” *Opt. Commun.*, vol. 33, no. 3, pp. 292–296, Jun. 1980.
- [RP Photonics] RP Photonics, “Encyclopedia of Laser Physics and Technology - fiber core, optical fiber, dopant ions, off-centered core.” [Online]. Available: http://www.rp-photonics.com/fiber_core.html. [Accessed: 23-Jun-2014].
- [Russell 92] P. S. J. Russell, “Photonic band gaps,” *Phys. World*, vol. 5, no. 8, pp. 37–42, 1992.
- [Russell 03] P. Russell, “Photonic Crystal Fibers,” *Science*, vol. 299, no. 5605, pp. 358–362, Jan. 2003.

- [Russell 06] P. S. J. Russell, "Photonic-Crystal Fibers," *J. Light. Technol.*, vol. 24, no. 12, pp. 4729–4749, Dec. 2006.
- [Sawinski 05] J. Sawinski, "Development of a head-mount fiber scanning system for imaging in vivo," 2005.
- [Sawinski 07] J. Sawinski and W. Denk, "Miniature random-access fiber scanner for in vivo multiphoton imaging," *J. Appl. Phys.*, vol. 102, no. 3, p. 034701, 2007.
- [Sawinski 09] J. Sawinski, D. J. Wallace, D. S. Greenberg, S. Grossmann, W. Denk, and J. N. D. Kerr, "Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 46, pp. 19557–19562, Nov. 2009.
- [Seibel 06] E. J. Seibel, R. S. Johnston, and C. D. Melville, "A full-color scanning fiber endoscope," in *Biomedical Optics 2006*, 2006, pp. 608303–608303.
- [Seibel 08] E. J. Seibel, "1 mm catheterscope," 2008, pp. 685207–685207–8.
- [Stepinac 03] T. Stepinac and G. Wagnières, "Caractérisation de tissus biologiques in vivo par imagerie de l'intensité ou du temps de vie de luminescence," 2003.
- [Stoller 02] P. Stoller, B.-M. Kim, A. M. Rubenchik, K. M. Reiser, and L. B. Da Silva, "Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon," *J. Biomed. Opt.*, vol. 7, no. 2, pp. 205–214, Apr. 2002.
- [Stoller 02 b] P. Stoller, K. M. Reiser, P. M. Celliers, and A. M. Rubenchik, "Polarization-Modulated Second Harmonic Generation in Collagen," *Biophys. J.*, vol. 82, no. 6, pp. 3330–3342, Jun. 2002.
- [Strupler 07] M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, P.-L. Tharaux, J.-L. Martin, E. Beaupaire, and M.-C. Schanne-Klein, "Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues," *Opt. Express*, vol. 15, no. 7, pp. 4054–4065, 2007.
- [Strupler 08] M. Strupler, M. Hernest, C. Fligny, J.-L. Martin, P.-L. Tharaux, and M.-C. Schanne-Klein, "Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling," *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 5, pp. 054041–054041–10, 2008.
- [Suran 09] E. Suran, "Imagerie discrète dans un réseau de guides optiques réalisé par inscription femtoseconde: focalisation discrète dans une fibre optique multicœur," Université de Limoges, 2009.
- [Tai 05] S.-P. Tai, T.-H. Tsai, W.-J. Lee, D.-B. Shieh, Y.-H. Liao, H.-Y. Huang, K. Zhang, H.-L. Liu, and C.-K. Sun, "Optical biopsy of fixed human skin with backward-collected optical harmonics signals," *Opt. Express*, vol. 13, no. 20, pp. 8231–8242, Oct. 2005.
- [Tavella 07] F. Tavella, Y. Nomura, L. Veisz, V. Pervak, A. Marcinkevicius, and F. Krausz, "Dispersion management for a sub-10-fs, 10 TW optical parametric chirped-pulse amplifier," *Opt. Lett.*, vol. 32, no. 15, pp. 2227–2229, Aug. 2007.
- [Tiaho 07] F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, "Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging

- microscopy,” *Opt. Express*, vol. 15, no. 19, pp. 12286–12295, Sep. 2007.
- [Tournois 69] P. Tournois, “Sur un interféromètre de phase à variation linéaire du temps de retard en fonction de la fréquence,” *CR Acad Sc Paris*, vol. 269, pp. 455–458, 1969.
- [Tournois 93] P. Tournois, “New diffraction grating pair with very linear dispersion for laser pulse compression,” *Electron. Lett.*, vol. 29, no. 16, pp. 1414–1415, Aug. 1993.
- [Treacy 69] E. B. Treacy, “Optical pulse compression with diffraction gratings,” *IEEE J Quantum Electron*, vol. 5, no. 9, pp. 454–458, Sep. 1969.
- [Vohnsen 08] B. Vohnsen and P. Artal, “Second-harmonic microscopy of ex vivo porcine corneas,” *J. Microsc.*, vol. 232, no. 1, pp. 158–163, Oct. 2008.
- [Volkmer 05] A. Volkmer, “Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 38, no. 5, p. R59, 2005.
- [Wadsworth 04] W. J. Wadsworth, R. M. Percival, G. Bouwmans, J. C. Knight, T. A. Birks, T. D. Hedley, and P. S.-J. Russell, “Very high numerical aperture fibers,” *IEEE Photonics Technol. Lett.*, vol. 16, no. 3, pp. 843–845, Mar. 2004.
- [Wang 05] Y. Wang, M. Bachman, G.-P. Li, S. Guo, B. J. F. Wong, and Z. Chen, “Low-voltage polymer-based scanning cantilever for invivo optical coherence tomography,” *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 1, pp. 53–55, Jan. 2005.
- [Williams 05] R. M. Williams, W. R. Zipfel, and W. W. Webb, “Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils,” *Biophys. J.*, vol. 88, no. 2, pp. 1377–1386, Feb. 2005.
- [Wu 09] Y. Wu, Y. Leng, J. Xi, and X. Li, “Scanning all-fiber-optic endomicroscopy systemfor 3D nonlinear optical imaging of biologicaltissues,” *Opt. Express*, vol. 17, no. 10, pp. 7907–7915, May 2009.
- [Wu 10] Y. Wu and X. Li, “Combined influences of chromatic aberration and scattering in depth-resolved two-photon fluorescence endospectroscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 1, no. 4, pp. 1234–1243, Nov. 2010.
- [Xi 12] J. Xi, Y. Chen, Y. Zhang, K. Murari, M.-J. Li, and X. Li, “Integrated multimodal endomicroscopy platform for simultaneous en face optical coherence and two-photon fluorescence imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 3, pp. 362–364, Feb. 2012.
- [Xie 14] X. S. Xie, “Stimulated Raman Scattering Microscopy,” 2014. [Online]. Available: <http://bernstein.harvard.edu/research/SRS.htm>.
- [Xu 96] C. Xu and W. W. Webb, “Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm,” *J Opt Soc Am B*, vol. 13, no. 3, pp. 481–491, 1996.
- [Yeh 02] A. T. Yeh, N. Nassif, A. Zoumi, and B. J. Tromberg, “Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and

- two-photon excited fluorescence,” *Opt. Lett.*, vol. 27, no. 23, pp. 2082–2084, Dec. 2002.
- [Yu 09] Q. Yu and A. A. Heikal, “Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level,” *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 95, no. 1, pp. 46–57, Apr. 2009.
- [Zhang 12] Y. Zhang, M. L. Akins, K. Murari, J. Xi, M.-J. Li, K. Luby-Phelps, M. Mahendroo, and X. Li, “A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 32, pp. 12878–12883, Aug. 2012.
- [Zhang 14] N. Zhang, T.-H. Tsai, O. O. Ahsen, K. Liang, H.-C. Lee, P. Xue, X. Li, and J. G. Fujimoto, “Compact piezoelectric transducer fiber scanning probe for optical coherence tomography,” *Opt. Lett.*, vol. 39, no. 2, pp. 186–188, Jan. 2014.
- [Zhao 10] Y. Zhao, H. Nakamura, and R. J. Gordon, “Development of a versatile two-photon endoscope for biological imaging,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 1, no. 4, pp. 1159–1172, Nov. 2010.
- [Zheng 13] Q. Zheng, H. Zhu, S.-C. Chen, C. Tang, E. Ma, and X. Chen, “Frequency-upconverted stimulated emission by simultaneous five-photon absorption,” *Nat. Photonics*, vol. 7, no. 3, pp. 234–239, Mar. 2013.
- [Zhuo 06] S. Zhuo, J. Chen, T. Luo, D. Zou, and J. Zhao, “Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in ex vivo human skin based on the combination of multichannel mode and Lambda mode,” *Opt. Express*, vol. 14, no. 17, pp. 7810–7820, Aug. 2006.
- [Zipfel 03] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, “Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 12, pp. 7075–7080, Jun. 2003.
- [Zipfel 03 b] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences,” *Nat Biotechnol*, vol. 21, pp. 1369–1377, Nov. 2003.

Table des illustrations

Figure 1 : Diagramme de Jablonski illustrant la fluorescence linéaire à un photon et la fluorescence non linéaire à deux photons.	4
Figure 2 : Réponses en fluorescence linéaire à un photon et en fluorescence non linéaire à deux photons. Rouge : excitation ; Bleu : réponse.	5
Figure 3 : Génération de seconde harmonique. Rouge : excitation ; Bleu : réponse.	6
Figure 4 : Génération de seconde harmonique par une molécule unique d'eau.	7
Figure 5 : Génération de seconde harmonique de deux molécules non centrosymétriques très proches ; a) : interférence constructive ; b) : interférence destructive.	8
Figure 6 : Rapport entre les réponses en SHG émises par des fibrilles de collagène détectées respectivement vers l'avant et vers l'arrière en fonction de l'inclinaison des fibrilles par rapport à l'axe optique [Zipfel 03]. En haut à droite : diagramme de rayonnement en fonction de l'inclinaison des fibrilles par rapport à l'axe optique qui est indiqué par une flèche.	9
Figure 7 : Microscope biphotonique	10
Figure 8 : Réponse en fluorescence à 3 photons. Rouge : excitation ; Bleu : réponse.....	12
Figure 9 : Réponse en THG. Rouge : excitation ; Bleu : réponse	13
Figure 10 : Réponses en SRS et CARS. a) avant ; b) après réponse de l'échantillon.....	14
Figure 11 : Image multiphotonique (2PEF/SHG) sans marquage d'un rein fibrosé de souris. Rouge : 2PEF endogène provenant des fluorophores contenu dans les tubules ; Vert : SHG provenant des fibres de collagène de type I présentent autour des artères ainsi que lors de fibrose [Strupler 07].	16
Figure 12 : Image multiphotonique (2PEF/SHG/THG) montrant la division cellulaire d'un embryon de poisson zèbre [Luengo-Oroz 12].....	17
Figure 13 : Image multiphotonique (2PEF/SHG) d'une coupe de cerveau de souris atteinte de la maladie d'Alzheimer [Kwan 09].....	18
Figure 14 : Microscope multiphotonique permettant une navigation virtuelle de l'animal étudié [Dombeck 10].	22
Figure 15 : Microscope de fluorescence non confocal miniature. Barre d'échelle : 5 mm [Ghosh 11]	23
Figure 16 : Guide d'image de 30 000 cœurs ayant un diamètre total de 0.8 mm.	29
Figure 17 : Inhomogénéité d'un guide d'image multi-cœur.	30
Figure 18 : Représentation d'une fibre à double gaine ; (a) : cœur monomode excitateur pour l'infrarouge ; (b) : première gaine collectrice multimode pour le visible ; (c) : seconde gaine.	31
Figure 19 : Image en microscopie électronique à balayage d'une fibre double gaine microstructurée air –silice commerciale (DC 165-16-Passive, NKT Photonics) ; (a) : cœur monomode plein en silice pure non dopée ; (b) : gaine collectrice microstructurée air-silice multimode ; (c) : couronne d'air ; (d) : manchon en silice pure.	33

Figure 20 : Image en microscopie électronique à balayage (MEB) de la partie centrale d'une fibre à cœur creux ; (a) : cœur ; (b) : cristal photonique [Russell 03].....	34
Figure 21 : Atténuation et dispersion d'une fibre à cœur creux commerciale (HC800-01, NKT Photonics).....	35
Figure 22 : Image en microscopie électronique à balayage d'une fibre double gaine à cœur creux [Brustlein 11] ; (a) : cœur central monomode creux ; (b) : microstructure air-silice ; (c) : gaine collectrice multimode en silice pure non dopée ; (d) : couronne d'air ; (e) : manchon.	36
Figure 23 : Système étireur-compresseur à fibre.	38
Figure 24 : Modulation de phase spectrale due à une dispersion normale.....	38
Figure 25 : Etireur à ligne dispersive 4 f repliée	40
Figure 26 : Etireur à réseaux.	40
Figure 27 : Automodulation de la fréquence par effet Kerr en l'absence de dispersion ($L \ll L_d$).	43
Figure 28 : Compression spectrale en sortie du système étireur-compresseur en présence d'effet Kerr ($n_2 > 0$) dans la fibre du compresseur.....	43
Figure 29 : MEMS [Flusberg 05]	45
Figure 30 : Dispositif d'imagerie basé sur un MEMS ; dimensions : 1 cm de diamètre pour 14 cm de long [Jung 08].....	45
Figure 31 : Dispositif d'imagerie basé sur le balayage de l'extrémité de la fibre (DCF) sous l'action d'une céramique piézoélectrique (PZT) de forme cylindrique [Wu 09].....	46
Figure 32 : Scanner à fibre optique de type résonnant / non résonnant basé sur l'emploi de deux céramiques piézoélectriques différentes [Wu 09].....	46
Figure 33 : Rôle de la micro-optique ; IR : Infrarouge ; VIS : Visible.	47
Figure 34 : lentille grin commerciale (ref. GT-MO-080-0415-810 de chez GRINTECH). La fibre endoscopique se situe à gauche de la lentille.	48
Figure 35 : Architecture d'un endomicroscope multiphotonique. IR : Infrarouge ; VIS : Visible.	50
Figure 36 : Schéma d'un endomicroscope biphotonique. [Gu 14 b]	51
Figure 37 : Schéma d'un endomicroscope biphotonique. [Ouzounov 13 b].....	52
Figure 38 : Image in vivo de rein de rat marqué avec de la fluorescéine en 2PEF. [Bao 08]..	55
Figure 39 : Image in vivo de rein de rat non marqué en 2PEF. [Ouzounov 13]	56
Figure 40 : Image en microscopie électronique à balayage du cœur de la fibre T1628C ; 1) : cœur à maintien de polarisation ; 2) : microstructure entourant le cœur central.....	61
Figure 41 : Trace d'autocorrélation obtenue à la sortie de la fibre T1628C de longueur $L = 2,07$ m lorsque que les deux modes propres à polarisation sont excités à l'entrée de façon équilibrée par une unique impulsion de polarisation adaptée. Le retard de groupe entre les deux modes mesuré sur cette figure vaut $\Delta t_g = 1,02$ ps.	62
Figure 42: Interférogramme spectral mesuré à XLIM issu de l'interférence spectrale entre les deux modes propres à polarisation, conformément à la méthode décrite par [Cao 94].	

La période des franges spectrales mesurée vaut $\Delta\lambda = 2,18$ nm pour une longueur de fibre égale à 2,07 m.....	63
Figure 43 : Image en microscopie électronique à balayage de la fibre T1628C à double gaine microstructurée air-silice. (a) : cœur central entourée de sa microstructure ; (b) : deuxième cœur = première gaine collectrice ; (c) : couronne d'air ; (d) : manchon de maintien.....	63
Figure 44 : Flexibilité de la fibre du PhLAM.....	64
Figure 45 : Fibres DC commerciales : 1) fibre NKT Photonics DC 165-16-Passive ; (a) : cœur central monomode ; (b) : gaine collectrice microstructurée multimode ; (c) : couronne d'air ; (d) : manchon ; 2) Liekki (DC 6/125 PM) ; (e) : cœur central monomode ; (f) : gaine collectrice multimode.	64
Figure 46 : Mesure de la résolution latérale en 2PEF pour la fibre T1628C	66
Figure 47 : Banc de mesure de l'efficacité de collection des fibres ; F : filtre (FF01-720/SP-25, Semrock) ; D1 : miroir dichroïque (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; MO : Micro-optique (voir Chapitre 5) ; O : objectif de microscope (UPLSAPO-60X, Olympus). Le module de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre sur lequel nous reviendrons ultérieurement n'est pas représenté sur cette figure.	67
Figure 48 : Mesure de l'efficacité de collection des trois fibres, fibre du PhLAM (T1624C), fibre NKT Photonics (DC 165-16-Passive) et la fibre Liekki (DC 6/125 PM).	68
Figure 49 : Banc de mesure de l'efficacité de collection de la fibre optique dans le cas d'un milieu diffusant ; F : filtre (FF01-720/SP-25, Semrock) ; D1 : miroir dichroïque (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; MO : Micro-optique (voir Chapitre 5) ; O : objectif de microscope (UPLSAPO-60X, Olympus). Le module de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre sur lequel nous reviendrons ultérieurement n'est pas représenté sur cette figure.	68
Figure 50 : Mesure de l'efficacité de collection des trois fibres, fibre du PhLAM (T1624C), fibre NKT Photonics (DC 165-16-Passive) et la fibre Liekki (DC 6/125 PM).	69
Figure 51 : Elargissement spectral à l'aide d'une fibre optique monomode standard.	70
Figure 52 : Mesure du spectre des impulsions (spectroscopie commerciale AvaSpec-2048 de chez Avantes), à la sortie du laser et à la sortie de la première fibre de 50 cm avec 420 mW dans cette dernière.....	71
Figure 53 : Etireur à grisms.....	72
Figure 54 : Schéma bloc du dispositif de déport d'impulsion.....	73
Figure 55 : Montage expérimental pour le déport d'impulsions ultra-courtes et intenses par fibre optique avec en sortie les moyens de caractérisation de ces impulsions.	74
Figure 56 : Mesures spectrales avec le spectroscopie commerciale AvaSpec-2048 (Avantes), à la sortie du laser, à la sortie d'une première fibre de 50cm, à la sortie de l'étireur à grisms et à la sortie de la fibre T1628C.....	74
Figure 57 : Trace d'autocorrélation intensimétrique à la sortie de la fibre T1628C ; la durée de cette autocorrélation vaut 60 fs ce qui correspond à une durée d'impulsion de 39 fs, dans l'hypothèse d'un profil d'impulsion en sech^2	75

- Figure 58 : Evolution de la durée autocorrélation en fonction de la puissance présente dans le cœur de la fibre. Un seul axe propre à polarisation a été excité lors de ces mesures. 76
- Figure 59 : Tests du système de détection en comptage de photons - (a) : évolution du rapport signal sur bruit S/N en fonction de la puissance d'excitation, pour une détection analogique (bleu) ou en comptage photons (rouge). Le comptage de photon est meilleur pour les faibles puissances et les faibles valeurs de S/N ; (b) : rapport signal à bruit en fonction du bruit en comptage de photons. L'évolution est linéaire mais la pente est inférieure à 1 ce qui veut dire que le système n'est pas limité par le bruit de photon ce qui correspondrait à : $S/N=N=S^{0.5}$ [Ferrand 11]..... 78
- Figure 60 : Comparaison entre détection analogique et détection en comptage de photons. Images brutes, non moyennées, données par l'endomicroscope multiphotonique (voir Chapitre 5 et 6) d'une coupe de rein de souris non marquée, en ex-vivo, pour 2 mW sur les tissus. De la gauche vers la droite : 2PEF, SHG, SHG+2PEF. Haut : détection analogique. Bas : comptage de photons. Barre d'échelle : 50 μm 79
- Figure 61 : Schéma expérimental du microscope multiphotonique fibré. $\lambda/2$: lame demi-onde ; Li : lentilles de collimation et de focalisation (L1 : A375TM-B, Thorlabs ; L2 : C110TME-B, Thorlabs ; L3 : C230TME-A, Thorlabs ; L4 : AL2520-A, Thorlabs) ; Di : miroirs dichroïques (D1 : FF705-Di01-25x36, Semrock ; D2 : Di02-R442-25x36, Semrock) ; Fi : filtres (F1 : FF01-720/SP-25, Semrock ; F2 : FF01-405/10-25, Semrock) ; XY scanner : miroirs galvanométriques (GVS 002, Thorlabs) ; OM : Objectif de microscope (W Plan-Apochromat 63x/1.0, Zeiss) ; PMT : Photomultiplicateur (H7422P-40, Hamamatsu)..... 81
- Figure 62 : Exemples de figures de balayage. Rouge : trajectoire du faisceau ; bleu : points échantillonnés à une fréquence temporelle fixe. 82
- Figure 63 : Image en génération de troisième harmonique en profondeur d'un embryon de poisson zèbre ; (a) : avec un balayage lignes/colonnes ; (b) : avec un balayage en spirale ; barre d'échelle : 100 μm [Olivier 10]..... 83
- Figure 64 : Résolution : (a) Mesure de la résolution latérale en 2PEF du microscope multiphotonique fibré. Profil diamétral de l'image d'une bille fluorescente de 0,1 μm de diamètre. (b) et (c) images de la même zone d'une coupe de rein de souris non marqué ex-vivo (voir Chapitre 6) données respectivement par un microscope multiphotonique commercial conventionnel non fibré de la marque Olympus appartenant à une autre équipe de XLIM (équipe Electrobiophotonique de la Chaire Santé du Labex SigmaLim) et par notre microscope multiphotonique fibré. Le rapport signal à bruit est plus grand sur l'image (b). Par contre la résolution est clairement meilleure sur l'image (c). 84
- Figure 65 : Mesure de la résolution axiale en 2PEF. 85
- Figure 66 : Configuration de la détection dans le cas de la microscopie en réflectance..... 86
- Figure 67 : Image en réflectance d'une grille métallique calibrée de pas égal à 50 μm (R1L3S3P, Thorlabs). 86
- Figure 68 : Image en génération de seconde harmonique d'un cristal doubleur au BBO usagé donné par le microscope multiphotonique fibré. Barre d'échelle = 50 μm 87
- Figure 69 : Image en génération de seconde harmonique de tendons de queue de rat donnée par le microscope fibré équipé de la fibre à gros cœur DC-165-16-passive de NKT-

Photonics. On reconnaît l'aspect fibrillaire mais la résolution est clairement sous-optimale. Détection dans la bande 400 nm – 410 nm. Barre d'échelle = 50 µm.....	87
Figure 70 : Image SHG dans la bande 400 nm – 410 nm de tendons de queue de rat selon deux polarisations rectilignes incidentes orthogonales. Barre d'échelle : 50 µm. Les directions de polarisation incidentes @ 810 nm sont approximativement les suivantes : gauche : ; droite :.....	88
Figure 71 : Image en génération de seconde harmonique (vert) du collagène et en fluorescence à deux photons (rouge) de l'élastine d'un tissu pulmonaire humain sain. Barre d'échelle : 50 µm.....	89
Figure 72 : Image en génération de seconde harmonique et fluorescence à deux photons de tissus pulmonaire sain ; Rouge : réponse en 2PEF (élastine) ; Vert : réponse en SHG (collagène) ; barre d'échelle : 50 µm ; 500x500 pixels ² /image ; 1 image/s et 40 µs/pixel.....	90
Figure 73 : Images en perspective en trois dimensions de tissus pulmonaires sains ; (a) : image unimodale avec une détection dans la bande 350 nm - 690 nm ; (b) : image bimodale ; rouge : réponse en 2PEF (élastine) dans la bande 465 nm – 690 nm ; vert : réponse en SHG (collagène) dans la bande 400 nm – 410 nm. Profondeur de la perspective = 350 µm.	91
Figure 74 : Images SHG de tendons de queue de rat prises tous les $\Delta z=20$ µm. En haut à gauche : z=0 µm ; en bas à droite : z=240 µm.	91
Figure 75 : Perspective applicative : plan d'une version portable du microscope multiphotonique fibré. Tous les composants sont représentés à l'échelle avec leurs dimensions réelles.	92
Figure 76 : Architecture du dispositif de balayage.	96
Figure 77 : Schéma de l'actuateur piézoélectrique.	98
Figure 78 : Déformation d'une céramique planaire selon la tension appliquée.....	98
Figure 79 : Déformation d'une céramique cylindrique [Chen 92].....	98
Figure 80 : Réponse de l'amplificateur E835.00 (PI).	100
Figure 81 : Réponse de la céramique en statique.	100
Figure 82 : Vérification de la présence d'hystérésis.....	101
Figure 83 : Réponse en fréquence de la céramique.....	101
Figure 84 : Résonateur mécanique.	102
Figure 85 : Evolution de la fréquence de résonance en fonction de la longueur du bras de fibre, pour une fibre standard de diamètre égal à 125 µm ; données expérimentales et théoriques.	103
Figure 86 : Fibres utilisées pour vérifier l'influence de la microstructure sur la fréquence de résonance ; 1) : 938Cf, 2) : 924Df.	104
Figure 87 : Evolution de la fréquence de résonance en fonction de la longueur pour les fibres 924Dfn et 938Cf ; données expérimentales et théoriques.....	104
Figure 88 : Plan du dispositif de balayage	105

Figure 89 : Fréquences de résonance théoriques pour un bras de fibre de 11.5mm. La réponse du 1 ^{er} harmonique est 6 fois plus faible que celle du fondamental.....	105
Figure 90 : Trajectoire suivie par la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe en dehors de la résonance ; (a) : excitation selon x ; (b) : excitation selon y.....	106
Figure 91 : Trajectoire tourbillonnante suivie par la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe à la résonance ($f_r=1415$ Hz) ; (a) : excitation selon x ; (b) : excitation selon y ; rouge : axes réels, x et y, de la céramique piézoélectrique	106
Figure 92 : Courbe de résonance théorique.....	107
Figure 93 : Amplitude d'oscillation de l'extrémité de la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe ; (a) excitation selon x ; (b) excitation selon y.....	107
Figure 94 : Axes du système. x et y : axes définis par les électrodes réelles ; X et Y : axes définis par les électrodes virtuelles correspondant aux axes propres du résonateur.....	109
Figure 95 : Balayage effectué par la fibre optique lors de l'excitation sur un seul axe (a) en utilisant un axe réel. (b) en utilisant un axe virtuel.....	110
Figure 96 : Superposition des deux axes virtuels.....	110
Figure 97 : Réponse en fréquence lors de l'excitation sur les axes virtuels ; Bleu : excitation de V_X ; Rouge : excitation de V_Y ; $f_{rX} = 1415$ Hz ; $f_{rY}=1417.5$ Hz.....	111
Figure 98 : Obtention d'une trajectoire elliptique malgré l'utilisation de signaux de commande en phase.....	111
Figure 99 : Evolution théorique du déphasage en fonction de la fréquence.	112
Figure 100 : Déphasage théorique entre les axes X et Y ; $f_{rX}=1415$ Hz ; $f_{rY}=1417.5$ Hz ; $Q=236$; Φ_0 <i>théorique</i> = 0.751 rad soit 43° à 1416 Hz.....	112
Figure 101 : Mise en phase des axes d'excitation virtuels. $\Phi_0 = 0.6$ rad soit 34.4°	113
Figure 102 : Balayage circulaire (a) avant, (b) après l'ajustement des poids des deux axes.	113
Figure 103 : Balayage spiral.....	115
Figure 104 : Description simplifiée des commandes utilisées ; en noir : $X(t)$ en forme de cosinus ; en rouge : $Y(t)$ en forme de sinus.....	116
Figure 105 : Simulation numérique des oscillations de la fibre optique lors de l'excitation unidimensionnelle par un signal sinusoïdal à 1416 Hz modulé par une rampe linéaire d'environ 88 ms. Rouge : excitation ; Bleu : oscillation de la fibre optique.	116
Figure 106 : Oscillations mesurées de la fibre optique lors de l'excitation par un signal sinusoïdal à 1416 Hz modulé par une rampe linéaire. Rouge : excitation ; Bleu : oscillations de la fibre optique mesurées avec le PSD.....	117
Figure 107 : Relâchement libre de la fibre après une excitation à 1416 Hz ; a) théorique ; 1 : régime forcé en spirale sortante ; 2 : amortissement libre de la fibre ; b) expérimental.	118
Figure 108 : Oscillations de la fibre à la cadence de 8 images par seconde dans une configuration faisant uniquement appel à l'amortissement libre de la fibre.	119
Figure 109 : Commande en trois temps appliquée à la céramique piézoélectrique, 1 : spirale sortante, acquisition de l'image ; 2 : freinage de la fibre ; 3 : repos.....	119

Figure 110 : Mesures des oscillations de la fibre optique à la cadence de 8 images par seconde ; a) freinage trop long ; b) freinage idéal.....	120
Figure 111 : Assemblage de trois doublets achromatiques commerciaux Edmund Optics (EO) ; L1 : ref. EO #65-569 ; L2 : ref. EO #65-568 ; L3 : ref. EO #65-567 (gauche : fibre optique ; droite : échantillon).	121
Figure 112 : Lentille grin GT-MO-080-0415-810 de chez GRINTECH. La fibre endoscopique se situe à gauche de la lentille.	122
Figure 113 : Mesure de la résolution latérale en 2PEF de l'endomicroscope multiphotonique. Profil diamétral de l'image d'une bille fluorescente de 0.1 μm de diamètre. a) pour l'assemblage de doublets achromatiques : $\Delta x = 0.83 \mu\text{m}$; b) pour la lentille grin : $\Delta x = 0.67 \mu\text{m}$	123
Figure 114 : Image en réflectance d'une grille calibrée de 50 μm de pas (R1L3S3P, Thorlabs). a) pour l'assemblage de doublets achromatiques : champ de vue = 400 μm ; b) pour la lentille grin : champ de vue = 185 μm	124
Figure 115 : Banc de mesure de l'efficacité de collection de l'endomicroscope ; F : filtre (FF01- 720/SP-25, Semrock) ; D1 : miroir dichroïque (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; MO : Micro-optique (assemblage de doublets achromatiques ou lentille grin) ; O : objectif de microscope (UPLSAPO-60X, Olympus). Le module de précompensation des effets linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre n'est pas représenté sur cette figure.	125
Figure 116 : Mesure de l'efficacité de collection des deux micro-optiques ; a) pour un milieu non diffusant ; a) pour un milieu diffusant ; rouge : pour l'assemblage de doublets achromatiques ; bleu : pour la lentille grin.....	125
Figure 117 : Schéma de la sonde finale encapsulée. Micro-optique : association des trois doublets achromatiques Edmund Optics.....	126
Figure 118 : Correspondance positions, signaux, instants.	126
Figure 119 : Schéma expérimental de l'endomicroscope multiphotonique. $\lambda/2$: lame demi-onde ; Li : lentilles de collimation et de focalisation (L1 : A375TM-B, Thorlabs ; L2 : C110TME-B, Thorlabs ; L3 : C230TME-A, Thorlabs ; L4 : AL2520-A, Thorlabs) ; Di : miroirs dichroïques (D1 : FF705-Di01-25x36, Semrock ; D2 : Di02-R442-25x36, Semrock) ; Fi : filtres (F1 : FF01-720/SP-25, Semrock ; F2 : FF01-405/10-25, Semrock) ;PMT : Photomultiplicateur (H7422P-40, Hamamatsu) ; OD : diamètre extérieur.	127
Figure 120 : Images en réflectance d'une grille métallique calibrée de pas égal à 50 μm (R1L3S3P, Thorlabs), acquises à 8 images par seconde ; a) image sans correction des problèmes lié au régime transitoire du scanner ; b) image après correction des distorsions.	129
Figure 121 : Images SHG dans la bande 400 nm – 410 nm de tendons de queue de rat selon plusieurs puissances moyennes d'excitation allant de 1 à 10 mW. Barre d'échelle : 50 μm	130
Figure 122 : Image SHG dans la bande 400 nm – 410 nm de tendons de queue de rat selon deux polarisations rectilignes incidentes orthogonales. Barre d'échelle : 50 μm . Les directions de polarisation incidentes @ 810 nm sont approximativement les suivantes : gauche : ; droite :.....	131

Figure 123 : Images de génération de seconde harmonique (vert) du collagène et de fluorescence à deux photons (rouge) de l'élastine d'un tissu pulmonaire humain sain. Barre d'échelle : 50 μ m.....	131
Figure 124 : Image de génération de seconde harmonique et de fluorescence à deux photons de tissu pulmonaire sain épais non marqué ; Rouge : réponse en 2PEF (élastine) ; Vert : réponse en SHG (collagène) ; barre d'échelle : 50 μ m ; 62500 pixels/image ; 8 image/s et 1.4 μ s/pixel. En bas à droite : image en perspective en 3D issue de la compilation d'un grand nombre de sections optiques entre z=0 et z=300 μ m donnée par le logiciel ImageJ.	132
Figure 125 : Image en transmittance d'une artère marquée au trichrome de Masson réalisée avec le microscope inversé Olympus IX71 ; a) en lumière blanche en bleu-vert les fibres de collagène ; b) en lumière blanche polarisée en rose-violet les fibres de collagène biréfringentes ; barre d'échelle : 50 μ m.	137
Figure 126 : Image d'une artère rénale fixée donnée par le microscope multiphotonique fibré du Chapitre 4 ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	138
Figure 127 : Image moyennée sur 4 acquisitions d'une artère rénale fixée donnée par le microscope multiphotonique fibré du Chapitre 4; rouge : réponse en fluorescence à deux photons ; vert : en génération de seconde harmonique ; barre d'échelle : 50 μ m.	138
Figure 128 : Image d'une artère rénale donnée par l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	139
Figure 129 : Image moyennée sur 4 acquisitions d'une artère rénale réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	139
Figure 130 : Image de rein fibrosé marqué au Rouge Sirius réalisée avec le microscope Olympus IX71 ; a) en lumière blanche ; rouge foncé = collagène ; b) en lumière blanche polarisée ; jaune-orangée = zone biréfringente (fibres de collagène) ; barre d'échelle : 50 μ m.	140
Figure 131 : Image d'un tissu rénal avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	140
Figure 132 : Image d'un tissu du rein avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	141
Figure 133 : Image moyennée sur 4 acquisitions d'un tissu du rein avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	141

Figure 134 : Image d'une artère d'un rein de souris non marqué avec le microscope multiphotonique fibré. On reconnaît très nettement l'artère au centre de l'image. L'artère est entourée de collagène (en vert sur l'image de droite) qui lui donne sa rigidité. En haut à droite on voit également des tubules rénaux.	142
Figure 135 : Image d'un rein sain avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; 1 : section d'un tubule comportant 5 noyaux cellulaires parfaitement identifiables; barre d'échelle : 50 μ m.	143
Figure 136 : Image d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	143
Figure 137 : Image d'un rein fibrosé à 21 jours avec le microscope multiphotonique fibré ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	144
Figure 138 : Image moyennée sur 2 acquisitions d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	144
Figure 139 : Photo de la souris après l'opération ayant pour but de sortir le rein.	145
Figure 140 : Photo de la souris lors de l'observation avec l'endomicroscope ; 1 : abaisse langue servant à maintenir le rein ; 2 : endomicroscope multiphotonique.	146
Figure 141 : Images de la souris données par les deux caméras de contrôle en éclairage IR à 950 nm ; Image de droite : zoom sur le rein.	146
Figure 142 : Image d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	147
Figure 143 : Image moyennée sur 4 acquisitions de la capsule entourant le rein réalisée l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μ m.	148
Figure 144 : Vidéo d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique sur animal vivant anesthésié sans marquage ; rouge : réponse en 2PEF des tubules rénales ; vert : réponse en SHG de la capsule rénale en bas à droite. La prise de vue et la diffusion de la vidéo sont à la même cadence (i.e. 8 images par secondes)	148
Figure 145 : Image d'un rein fibrosé à 13 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) Co-localisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 100 μ m.	149

Figure 146 : Vidéo de l'acquisition d'une séquence image d'un rein fibrosé à 13 jours réalisée avec l'endomicroscope multiphotonique ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; champ de 450 μm	149
Figure 147 : Image de fluorescence à deux photons d'un rein fibrosé à 6 jours réalisée l'endomicroscope multiphotonique à différentes profondeurs sous la surface du tissu ; barre d'échelle : 50 μm ; 62500 pixels/image ; 8 image/s et 1.4 μs /pixel.	150
Figure A1 : Schéma expérimental du banc de mesure de section efficace d'absorption à deux photons ; laser : titane-saphir (800 nm, 76 MHz, 150 fs) ; Miroir dichroïque (FF510-Di01, Semrock) ; OM : Objectif de microscope (W Plan-Apochromat 63x/1.0, Zeiss) ; Filtre spatial (iris réglable) ; Prisme : Prisme en silice fondue ; Filtre : Filtre passe bas à 690 (XVS0690, Asahi Spectra) ; Caméra : ORCA II ERG (C4742-98-24ERG, Hamamatsu) ; L : lentille d'une focale de 7 mm.....	161
Figure A2 : Photo du banc de spectroscopie.	162
Figure A3 : Spectre d'émission d'eau de différentes provenances.	162
Figure A4 : Spectre d'émission de l'eau en fonction de la longueur d'onde.	163
Figure A5 : Image en fluorescence à deux photons de cellules de tabac de type TBV-2 sans marquage.	163
Figure A6 : Images en perspective en trois dimensions de cerveaux de souris obtenues en fluorescence à deux photons (Aucune réponse n'est détectée sur le canal SHG); (a) cerveau saine ; (b) cerveau ayant une tumeur ; barre d'échelle : 50 μm	164
Figure A7 : Images de fœtus de poulet obtenues en fluorescence à deux photons ; (a) barre d'échelle : 50 μm ; (b) zoom sur la partie encadrée de l'image (a) ; barre d'échelle 10 μm ; 1 : noyau ; 2 : cytoplasme ; 3 : mésoderme ; 4 : fluide cérébrospinal.	165
Figure A8 : Images en perspective en trois dimensions de tissus aortiques ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; (1) : globule rouge ; barre d'échelle : 50 μm ;.....	165
Figure A9 : Schéma expérimental de l'endomicroscope multiphotonique à balayage proximal. $\lambda/2$: lame demi-onde ; Li : lentilles de collimation et de focalisation (L1 : A375TM-B, Thorlabs ; L2 : C110TME-B, Thorlabs ; L3 : Lentille sur mesure (Mauna Kea Technologies) ; D1 : miroirs dichroïques (FF705-Di01-25x36, Semrock) ; Fi : filtres (XVS0690, Asahi Spectra ; F2 : FB400-10, Thorlabs) ; XY scanner : miroirs galvanométriques (GVS 002, Thorlabs) ; PMT : Photomultiplicateur (H7422P-40, Hamamatsu).	166
Figure A10 : Images d'un tissu de bronche humaine saine, réalisée au travers d'un faisceau de fibres sans optique distale (tissu en contact avec la fibre) ; a) en fluorescence à deux photons ; b) en génération de seconde harmonique ; c) colocalisation des deux réponses ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG.....	167
Figure A11 : Images d'alvéoles pulmonaires humaines saines, réalisées au travers d'un faisceau de fibres sans optique distale (tissu en contact avec la fibre) en fluorescence à deux photons.	167

Figure A12 : Images en perspective en trois dimensions de tissus d'alvéoles pulmonaires humaines saines ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm ; 168

Figure A13 : Images en perspective en trois dimensions de tissus aortiques ; rouge : réponse en 2PEF ; vert : réponse en SHG ; barre d'échelle : 50 μm ; 168

Table des tableaux

Tableau 1 : liste des composants utilisés dans les deux endomicroscopes ayant permis des observations in vivo in situ.	53
Tableau 2 : Résumé des résultats obtenus par les endomicroscopes sélectionnés	54
Tableau 3 : Récupitulatif des caractéristiques des fibres optiques comparées.....	65
Tableau 4 : Récupitulatif des caractéristiques des micro-optiques comparées.	123

Titre: Développement d'un endomicroscope multiphotonique compact et flexible pour l'imagerie in vivo haute résolution de tissus biologiques non marqués

Résumé: La microscopie multiphotonique est un outil essentiel d'investigation en biologie cellulaire et tissulaire. Son extension à l'endoscopie est l'objet d'intenses efforts de recherche pour des applications en neurosciences (imagerie cérébrale du petit animal) ou en clinique (diagnostic précoce, aide à la biopsie). Ce manuscrit porte sur le développement d'un endomicroscope multiphotonique présentant des performances inédites. Ce dispositif est alimenté par un oscillateur titane-saphir standard. Vient ensuite un module de pré-compensation des distorsions linéaires et non linéaires se produisant dans la fibre endoscopique. Ce module permet d'obtenir des impulsions compressées de 39 fs à la sortie d'une fibre microstructurée air-silice innovante à double gaine de 5 mètres de long qui est optimisée pour l'excitation multiphotonique (cœur central de 3,4 μm à maintien de polarisation) et la collection du signal produit par les cibles biologiques. A l'extrémité de la fibre, on trouve une sonde endoscopique, de 2,2 mm de diamètre pour 37 mm de long, composée d'un micro-scanner à fibre optique et d'un micro-objectif achromatique de distance de travail supérieure à 400 μm . La résolution spatiale de l'appareil vaut 0,83 μm et l'acquisition se fait en simultané sur deux canaux spectraux à 8 images/s. L'appareil a permis l'enregistrement d'images *in vivo* sans marquage des tubules et de la capsule rénale, respectivement par fluorescence à deux photons des flavines et par génération de second harmonique du collagène, avec 30 mW sur les tissus et jusqu'à 300 μm sous la surface de l'organe.

Mots-clés: Imagerie non linéaire par fibre optique – Fibres microstructurées air-silice à double gaine – Compensation de dispersion – Effets non linéaires optiques – Micro-scanner à fibre optique – Micro-optique pour l'endoscopie – Instrumentation pour le biomédical – Imagerie in vivo sans marquage.

Title: Development of a compact and flexible multiphoton endomicroscope for in vivo high-resolution imaging of label-free biological tissues

Abstract: Multiphoton microscopy is an essential investigative tool in cell and tissue biology. Its extension to endoscopy is the subject of intensive research for applications in neuroscience (brain imaging of small animals) or clinical (early diagnosis, help for biopsy). This manuscript focuses on the development of an endomicroscope with multiphoton unprecedented performance. This device is powered by a standard titanium-sapphire oscillator. Then comes a pre-compensation module of linear and nonlinear distortions occurring in the endoscopic fiber. This module provides compressed pulses of 39 fs at the direct output of 5 meters long innovative double-clad air-silica microstructured fiber which is optimized for multiphoton excitation (polarization maintaining central core of 3.4 μm) and the collection of the signal produced by biological targets. At the end of the fiber, there is an endoscopic probe, 2.2 mm in diameter and 37 mm long, composed of a micro fiber scanning system and an achromatic micro-objective with a working distance greater than 400 μm . The spatial resolution of the device is 0.83 μm and the acquisition is done simultaneously on two spectral channels at 8 frames/s. The device has recorded in vivo images without label of the tubules and the renal capsule, respectively by two-photon excitation fluorescence of flavins and second harmonic generation of collagen, with 30 mW on the tissues and 300 μm below the surface of the organ.

Keywords: Fiber optics nonlinear imaging – Double-clad air-silica microstructured fibers – Dispersion compensation – Nonlinear optical effects – Micro fiber scanning system – Micro-optics for endoscopy – Instrumentation for biomedical – Label-free in vivo imaging